

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

Disertación Previa a la obtención del Título de Bioquímica Clínica

Título

Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Cándida*
obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en
Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016.

Autor de la disertación

Jenny Elizabeth Guerrero Miranda

Nombre del Director

Magister. José Eduardo Villacís Acuña

QUITO, 2016

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **JENNY ELIZABETH GUERRERO MIRANDA con C.I: 1724445422** autora del trabajo de graduación intitulado: **“Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de especies de *Candida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016”**, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **ESCUELA DE BIOANÁLISIS**.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.



JENNY ELIZABETH GUERRERO MIRANDA

C.I. 1724445422

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Bioquímica Clínica de la Srta. Jenny Elizabeth Guerrero Miranda sobre el tema “Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de especies de *Candida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



José Eduardo Villacís Acuña. Mgt.

Director de la Disertación

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fortaleza en los momentos difíciles, mis padres Yolanda Miranda y José Guerrero, ya que con su apoyo logré culminar mi carrera profesional, además con mucho cariño y amor a mis queridos abuelitos.

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, y a la vez a la FACULTAD DE BIOANÁLISIS por desarrollar mis conocimientos y aptitudes en el campo de la salud.

Sinceros agradecimientos al Magister Eduardo Villacís por su ayuda y sobre todo paciencia en la elaboración del presente trabajo de investigación y a todo el personal que forma parte del Centro de Referencia Nacional de Resistencias a los Antimicrobianos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. “Leopoldo Izquieta Pérez”

Un agradecimiento muy especial a los lectores de tesis, Magister Andrés Zabala y Doctor Carlos Flores quienes fueron parte de mi formación académica y contribuyeron con su conocimiento en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Mami, agradezco todo el esfuerzo que hiciste y sigues haciendo para que pueda cumplir el sueño de ser profesional, eres una gran mujer y sobre todo una madre ejemplar; con el pasar del tiempo comprendí tu frase: “*Primero la educación*”.

Gracias a mi papá y mi hermano, por su apoyo y cariño incondicional; un agradecimiento especial a mi ñaña que a pesar de la distancia siempre está conmigo.

A Stalin, por haber compartido conmigo esta difícil pero no imposible etapa de mi vida universitaria y siempre darme ánimos con palabras de amor para seguir luchando.

A mis amigas, Katy, Dany, Cathe, Catty, por su apoyo emocional e intelectual.

A todos quienes formaron y forman parte de esta meta cumplida. Gracias.

Jenny Guerrero M.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	II
CERTIFICACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
LISTA DE SIGLAS.....	6
CAPÍTULO I.....	7
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. JUSTIFICACIÓN	9
1.2. OBJETIVOS	11
1.2.1. GENERAL.....	11
1.2.2. ESPECÍFICOS.....	11
1.3. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	12
CAPÍTULO II.....	13
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	13
2.1. ANTECEDENTES	13

2.2.	Especies del Género <i>Candida</i>	14
2.3.	Hábitat	15
2.4.	Características microbiológicas de <i>Candida</i>	16
2.5.	Características metabólicas.....	17
2.6.	Características genéticas.....	17
2.7.	Factores de virulencia.....	17
2.7.1.	Capacidad de adhesión a tejidos	17
2.7.2.	Dimorfismo levadura micelio.....	18
2.7.3.	Hidrofobicidad a la superficie celular	19
2.7.4.	Secreción de proteinasas.....	19
2.8.	Dinámica entre <i>Candida</i> y el huésped.....	20
2.9.	Candidiasis mucocutánea	20
2.10.	Candidiasis cutánea	21
2.11.	Candidiasis del aparato urinario	21
2.12.	Candidiasis invasiva	21
2.12.1.	Factores predisponentes del huésped para desarrollar candidiasis invasiva..	22
2.13.	Candidiasis diseminada	22
2.14.	Endocarditis.....	22
2.15.	Métodos diagnósticos	22
2.15.1.	Estudios morfológicos	23
2.15.2.	Medios de Cultivo	23

2.15.3. Estudio bioquímico.....	24
2.15.4. Pruebas rápidas de identificación	25
2.15.5. Métodos automatizados	25
2.15.6. Métodos inmunológicos	25
2.15.7. Biología molecular	26
2.16. Antifúngicos utilizados para tratamiento de candidemias	26
2.16.1. Azoles	26
2.16.2. Polienos	27
2.16.3. Equinocandinas.....	28
2.17. Mecanismos de resistencia a antifúngicos.....	28
2.18. Resistencia a Azoles	29
2.19. Resistencia a equinocandinas	29
2.20. Resistencia a Polienos	29
MARCO CONCEPTUAL	30
CAPÍTULO III	32
MARCO METODOLÓGICO	32
3.1. Tipo de estudio.....	32
3.2. Población de estudio y muestra.....	32
3.3. Criterios de inclusión	32
3.4. Criterios de exclusión	32
3.5. Tamaño de la muestra	33

3.6. MATERIALES Y REACTIVOS	33
Materiales.....	33
3.7. PROCEDIMIENTO	35
3.7.1. FASE I.....	35
3.7.2. FASE II.....	35
3.7.3. FASE III	36
3.7.4. FASE IV	38
3.7.5. FASE V.....	38
CAPÍTULO IV	40
RESULTADOS	40
4.1. Población de estudio	40
4.2. Identificación fenotípica de especies de <i>Candida</i>	41
5.1. Perfil de resistencia de cepas de <i>Candida</i> CLSI - EUCAST	45
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Epidemiología de cepas de <i>Candida</i> obtenidas de casas de Salud del país, 2007-2016	40
Tabla 2 Características fenotípicas de las especies de <i>Candida</i>	42
Tabla 3 Morfología de las especies de <i>Candida</i> en Agar Harina de Maíz con Tween 80 ..	43
Tabla 4 Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas invasivas	45
Tabla 5 Susceptibilidad a los azoles de primera y segunda generación de acuerdo a puntos de corte establecidos en CLSI, 2008	45
Tabla 6 Susceptibilidad a los azoles de primera y segunda generación de acuerdo a puntos de corte establecidos en EUCAST, 2015	46
Tabla 7 Susceptibilidad a las equinocandinas de acuerdo a puntos de corte establecidos por CLSI, 2008	46
Tabla 8 Susceptibilidad a las equinocandinas de acuerdo a puntos de corte establecidos por EUCAST, 2015	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribución mundial de especies de <i>Candida</i>	16
Figura 2 Estructura química de Anfotericina B.	27
Figura 3 Estructura química de las equinocandinas.	28
Figura 4 Presencia de clamidosporas en <i>Candida albicans</i> y estructura morfológica.	36
Figura 5 Especies de <i>Candida</i> en CHROMagar®.	37
Figura 6 Formación de tubo germinal.	41
Figura 7 Prueba de Zimograma-Auxonograma.	82
Figura 8 Escala 0.5 Mcfarland.	83

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	Procedimiento recuperación de cepas de <i>Candida</i>	75
ANEXO II	Procedimiento de la prueba de tubo germinal	76
ANEXO III	Procedimiento para identificación morfológica y clamidosporas en agar harina de maíz	77
ANEXO IV	CHROMagar® principios de procedimiento	78
ANEXO V	Preparación de medios para Zimograma-Auxonograma	81
ANEXO VI	Procedimiento de Inoculación por método de dilución colorimétrica	83
ANEXO VII	Criterios para interpretación de CIM para especies de <i>Candida</i> CLSI.....	86
ANEXO VIII	Puntos de corte EUCAST, 2015..	87
ANEXO IX	Control de calidad en medios de cultivo	88
ANEXO X	Características fenotípicas de las cepas estudiadas..	89
ANEXO XI	Resultados en CHROMagar®	93
ANEXO XII	Concentración mínima inhibitoria de cepas estudiadas.	95

RESUMEN

Las especies del género *Candida* forman parte de la flora normal en el ser humano en cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina; sin embargo, en estados de inmunosupresión, desbalance de la flora bacteriana o ruptura de las barreras epiteliales puede propagarse por el torrente circulatorio e invadir otros órganos, convirtiéndose en patógeno oportunista.

En las últimas décadas las infecciones causadas por *Candida* han aumentado considerablemente, por lo que es importante conocer la resistencia a antifúngicos que presentan las cepas de *Candida* con el fin de mejorar la terapia farmacológica del paciente disminuyendo así la tasa de mortalidad. *Candida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia, no obstante, se ha reportado un aumento de las especies de *Candida no albicans*, algunas de ellas resistentes a fármacos antifúngicos como Fluconazol.

Debido al cambio de epidemiología y resistencia de especies del género *Candida*, el objetivo de ésta investigación fue establecer la identificación, susceptibilidad y distribución de las especies de *Candida* por muestras, obtenidas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de enero 2007 a abril 2016. Para lo cual se estudiaron 100 cepas de *Candida albicans* y *no albicans*. Para la identificación fenotípica se utilizó pruebas convencionales como: tubo germinal, producción de clamidosporas en agar harina de maíz e identificación de cepas en CHROMagar®; y para la determinación de susceptibilidad antifúngica se usó la técnica de microdilución colorimétrica utilizando el sistema de sensibilidad Sensititre YeastOne ante Anidulafungina, Anfotericina B, Micafungina, Caspofungina, 5-Flucitosina, Posaconazol, Voriconazol, Itraconazol y Fluconazol.

Los resultados obtenidos en éste estudio muestran que las infecciones producidas por *Candida* se presentan en algunos Centros de Salud, Hospitales y Clínicas del Ecuador. La frecuencia de infecciones fúngicas por *Candida* se presentó de la siguiente manera: Hospital de tercer nivel (34%) Hospital pediátrico de tercer nivel (53%), Hospital de segundo nivel (1%) Clínica particular (1%), Centros, Sub-centros de salud y otros (11%).

Conforme a las muestras receptadas en el laboratorio de referencia del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública se clasificaron a las cepas de *Candida* de acuerdo a la muestra donde fueron aisladas, es así que la mayor parte de aislamientos fue en lavado bronquial (29%), orina (22%), seguido de sangre (13%).

Se realizó pruebas de susceptibilidad antifúngica a 20 cepas invasivas de *Candida*, debido a la muestra donde provenían y posibles factores de riesgo que pudieran presentar los pacientes, además en estudios realizados en Colombia se han encontrado datos donde la mortalidad en pacientes con candidemias invasivas llega al 59% (Cortés et al., 2013). De acuerdo a los resultados el 5% de las cepas mostraron resistencia a Itraconazol y Fluconazol y otro 5% reveló ser sensible a dosis dependiente en cuanto a la exposición con Voriconazol.

Los datos reflejados en el estudio muestran que de las 100 cepas estudiadas el 53% pertenece a un hospital pediátrico; así mismo se encontró resistencia a Fluconazol e Itraconazol en *Candida glabrata* y sensible a dosis dependiente a Voriconazol además se identificó que el 10% de las cepas de *Candida tropicalis* pertenecen al grupo de No Sensibles de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria que presentaron, evidenciándose además que el 5% de *Candida tropicalis* presentan resistencia a los azoles; sin embargo, no se encontró resistencia en cepas de *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVE

Candidemia, *Candida albicans*, *Candida no albicans*, susceptibilidad antifúngica.

ABSTRACT

The *Candida* species are part of the normal flora in humans in oral cavity, gastrointestinal tract, and vagina; however, in states of immunosuppression, imbalance of bacterial flora or rupture of epithelial barriers can spread through the bloodstream and invade other organs, becoming opportunistic pathogen.

In recent decades the *Candida* infections have increased considerably, making it important to know the resistance presented antifungals *Candida* strains in order to improve drug therapy patient thus decreasing the mortality rate. *Candida albicans* is the most frequently isolated species, however, it has reported an increase in *non-albicans Candida* species, some of them resistant to antifungal agents such as Fluconazole.

Due to changing epidemiology and resistance of *Candida* species, the objective of this research was to establish the identification, susceptibility and distribution of species of *Candida* samples, obtained from the National Institute for Research in Public Health in April 2016, to which were studied 100 strains of *Candida albicans* and *non-albicans*: 60 *Candida albicans* strains (60%), 26 strains of *Candida tropicalis* (26%), 7 strains of *Candida glabrata* (7%), 4 strains *Candida guilliermondii* (4%), one strain of *Candida lusitanae* (1%), one strain of *Candida pseudotropicalis* (1%) and 1 strain of *Candida parapsilosis* (1%). For phenotypic identification as conventional tests used: germ tube production, chlamydosporas, cornmeal agar and identification of strains in CHROMagar®; and for determination of antifungal susceptibility, microdilution colorimetric technique it was used using the system sensitivity to Sensititre YeastOne. Antidulafungin, Amphotericin B, Micafungin, Caspofungin, 5-Flucytosine, Posaconazole, Voriconazole, Itraconazole and Fluconazole.

The results obtained in this study show that *Candida* infections occur in some Health Centers, Hospitals and Clinics of Ecuador. The frequency of fungal infections *Candida* is presented as follows: Hospital of third level (34%) Children's Hospital of third level (53%), Hospital of second level (1%) Clinical particularly (1%), Centers, Sub centers and others (11%).

Under samples obtained in the reference laboratory of the National Institute for Public Health Research were classified strains of *Candida* according to the sample where they were isolated, so that most of isolates was in bronchial lavage (29%) , urine (22%), followed by blood (13%).

Antifungal tests 20 invasive strains of *Candida* susceptibility was performed because the sample which they came and potential risk factors that could present patients. According to the results 5% of the strains showed resistance to Itraconazole and Fluconazole and another 5% dependent proved to be sensitive as to Voriconazole exposure dose.

The data shown in the study show that of the 100 strains studied 53% belongs to a pediatric hospital; likewise it was resistant to Fluconazole and Itraconazole in *Candida glabrata* and sensitive to dose dependent Voriconazole also identified that 10% of strains of *Candida tropicalis* belong to the group of non-sensitive according to the minimum inhibitory concentration had also evidenced that 5% of *Candida tropicalis* are resistant to azoles; however, no resistance was found in strains of *Candida albicans*.

KEYWORDS

Candidemia, *Candida albicans*, *Candida non-albicans*, antifungal susceptibility.

LISTA DE SIGLAS

AB	Anfotericina B
ALS	Secuencia tipo aglutinina
AND	Anidulafungina
CAS	Caspofungina
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
FC	5- Flucitosina
FZ	Fluconazol
I	Intermedio
IL	Interleucina
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud
IZ	Itraconazol
MF	Micafungina
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
PZ	Posaconazol
R	Resistente
S	Sensible
SDD	Sensible dosis dependiente
VOR	Voriconazol

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Candida* pertenecen a la *Phylum Ascomycotina* (Castañón Olivares, 2016), clase *Saccharomycetes* (Murray et al., 2013); son organismos eucariotas los cuales tienen la particularidad de formar levaduras, pseudohifas e hifas, siendo la última una característica de los hongos patógenos para invadir tejidos (Guarro, 2012), a excepción de *Candida glabrata* la cual solo se presenta en forma levaduriforme.

Se han identificado aproximadamente 150 especies de *Candida* de las cuales hasta el momento se conocen 15 especies principales causantes de candidemias. (De la Torre-Saldaña et al., 2014)

En un estudio realizado por Nucci y colaboradores en América Latina durante el mes de noviembre del 2008 a octubre del 2010 se encontró que la incidencia de candidemia en el Ecuador es de 0.016% por cada 1000 pacientes al día (Nucci et al., 2013), además se reporta una morbilidad y mortalidad de aproximadamente el 35% en pacientes que presentan candidiasis invasiva (World Health Organization, 2014), generando así un impacto económico para las casas de salud, de tal manera que han ido adquiriendo gran importancia en los últimos años a nivel mundial debido a la resistencia adquirida que presentan algunas especies de *Candida* y al cambio de epidemiología de las mismas (Pfaller, 2012).

A pesar de existir escasos estudios de candidemias, se encontró en la ciudad de Madrid, España que *Candida* ocupa los primeros lugares en aislamientos en hemocultivos, mucosas, orina, entre otros fluidos (Escribano et al., 2013). Por formar parte de la flora

normal en piel y tubo digestivo, *Candida* invade a partir de mucosas relacionándose con el estado de inmunosupresión del paciente (Bicanic & Harrison, 2014); se sabe que entre el 5% - 15% de personas que ingresan por atención médica adquieren algún tipo de infección fúngica, siendo importante mencionar que dichas infecciones han ido aumentando año tras año a pesar del control y capacitación que se da al personal médico en cuanto a medidas de higiene y esterilización a materiales de trabajo (Cornistein et al., 2013).

El presente trabajo pretende responder la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué patrón de resistencia antifúngica presentan las especies de *Candida* aisladas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública y cuál es la distribución de acuerdo a la muestra donde se obtiene?

Los resultados de éste estudio ayudarán a conocer e identificar las especies causantes de infecciones fúngicas tanto leves como severas, además del perfil de susceptibilidad antifúngica que presentan para así llegar a un diagnóstico y tratamiento más certero.

1.1. JUSTIFICACIÓN

Las especies de *Candida* son organismos saprófitos que causan infecciones tanto locales como invasivas (Figueras et al., 2011). *Candida albicans* se considera el agente más común que causa candidiasis, sin embargo en los últimos años se ha identificado un aumento de aislamientos de *Candida no albicans*, lo cual involucra la investigación constante en cuanto a su epidemiología (Sardi et al., 2013). las candidemias representan la cuarta causa más común de infecciones en Colombia y Estados Unidos (Arias et al., 2012) (Falagas et al., 2010), siendo un problema en el área de salud ya que causa un alto riesgo de muerte y mayor tiempo de estancia hospitalaria (Cornistein et al., 2013).

Los reportes de resistencia antifúngica mencionan que los individuos tratados por tiempo prolongado con azoles generan resistencia, así mismo la falla terapéutica de éstos pacientes puede deberse a la mala identificación de cepas con resistencia intrínseca o por la presencia de cepas con resistencia secundaria, por otro lado se conoce que el gold standard para tratar infecciones fúngicas es la Anfotericina B, sin embargo hasta el día de hoy no existen datos de resistencia a éste antifúngico (Gutiérrez-Martínez et al., 2012).

En el Ecuador son escasas las investigaciones que se han realizado acerca de resistencia antifúngica, especialmente de las subespecies del género *Candida*; es por ello que el objetivo de éste trabajo es identificar subespecies de *Candida* en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y determinar perfiles de resistencia para mejorar el diagnóstico de infecciones micóticas proporcionando un tratamiento con fármacos antifúngicos adecuados dependiendo de la especie de *Candida* causante de la infección.

Es importante conocer la distribución de candidemias ya que las especies de *Candida* varían de acuerdo a la muestra donde se aísla (Alburquenque et al., 2013), del

mismo modo es trascendental conocer la especie que prevalece en el Ecuador así también como el perfil de resistencia que presentan para proveer un tratamiento antifúngico más eficaz. (Calvo et al., 2010)

Los resultados obtenidos beneficiarán al personal de salud, ya que se dará a conocer la resistencia antifúngica que presentan las distintas especies administrando un tratamiento más específico, para mejorar la calidad de vida del paciente.

El presente estudio resultó ser viable gracias a la disponibilidad de cepas conservadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, así también como la prestación de equipos e infraestructura.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. GENERAL

Establecer la identificación, susceptibilidad y distribución de las especies de *Candida* en muestras obtenidas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de enero 2007 a abril 2016.

1.2.2. ESPECÍFICOS

- Determinar las especies de *Candida* en muestras clínicas aisladas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de enero 2007 a abril del 2016.
- Reconocer macroscópicamente las colonias de cada especie de *Candida*, además de las estructuras mediante observación microscópica.
- Identificar el perfil de resistencia mediante el método de concentración mínima inhibitoria de las distintas cepas de *Candida* aisladas en muestras obtenidas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de enero 2007 a abril del 2016.

1.3. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

El agar cromocandida para identificación de subespecies de *Candida*, solo es capaz de detectar 4 de las 15 especies causantes de candidemia (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*).

No se puede contar con la historia clínica del paciente para conocer de mejor manera la clínica de la enfermedad.

Limitaciones económicas, por cuanto no se pudo realizar el perfil de resistencia a todas las cepas de *Candida* involucradas en éste estudio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES

Las infecciones por *Candida* ocupan el cuarto lugar en Colombia y en Estados Unidos (Arias et al., 2012) (Falagas et al., 2010), evidenciándose en las últimas décadas un aumento de especies de *Candida no albicans* (Lobaina et al., 2010), además se han reportado diversos tipos de resistencia por parte de éstos microorganismos, especialmente al grupo de los azoles. (Malbrán, 2015)

Entre los hallazgos publicados relacionados con el presente estudio se encuentran los siguientes: Fernández, 2012, desarrolló su tesis de candidiasis oral en pacientes sometidos a radioterapia por cáncer de cabeza y cuello y factores asociados. Determinó que los pacientes que presentan mayor prevalencia de candidiasis son aquellos que están en tratamiento radioterapéutico (Fernández, 2012), siendo éste uno de los factores predisponente para desarrollar candidemias, el estudio que realiza Cruz y Piontelli, 2011 menciona además que los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y pacientes inmunocomprometidos son muy susceptibles a padecer infecciones causadas por levaduras (Cruz & Piontelli, 2011). Estas investigaciones demuestran que pacientes en estado de inmunosupresión son predisponentes a adquirir infecciones fúngicas, por lo que es necesario contar con un protocolo de manejo al paciente para administrar una terapia farmacológica adecuada evitando así resistencias antifúngicas.

En el estudio realizado por Sardi, 2013 menciona que la mortalidad aumenta a causa de infecciones por especies de *Candida no albicans*, así mismo se elevan los casos

de resistencia a antifúngicos convirtiéndose en un problema debido a número restringido de fármacos antifúngicos.(Sardi et al., 2013)

De acuerdo a investigaciones relacionadas con el cambio de epidemiología, Zomorodian y colaboradores, 2011 indican que existe un número elevado de pequeñas mutaciones en las levaduras que se aislaron por pérdida de ADN mitocondrial o mutación en el ADN genómico y plantean que ésta puede ser la causa de problemas del tratamiento antifúngico (Zomorodian et al., 2011)

Con dicho antecedente, el estudio realizado por Pappas y colaboradores, 2009 propone una guía de tratamientos para candidiasis local y sistémica ya que la epidemiología de las resistencias ha cambiado enfocándose en la administración correcta de equinocandinas y azoles de amplio espectro. (Pappas et al., 2009)

2.2. Especies del Género *Candida*

Los hongos son organismos eucariotas que pertenecen al reino Fungi, siendo la mayor parte de ellos saprófitos (*sapros* = putrefacto y *fyton* = planta) es decir, que su alimento proviene de materia orgánica en descomposición o muerta (Buzón et al., 2013). Se caracterizan por la formación de hifas, observándose como estructuras filamentosas que en conjunto forman el micelio. (Guarro, 2012)

Candida es un organismo unicelular perteneciente al *Phylum Ascomycotina*, dentro del cual se han identificado 150 especies aproximadamente (Castañón Olivares, 2016), de las cuales 15 han sido considerados como patógenos siendo los siguientes los organismos principales causantes de candidemias: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*, *Candida*

kefyr, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* y *Candida norvegensis*.
(Yapar, 2014)

Candida albicans es el patógeno más aislado en infecciones fúngicas (Naglik et al., 2014), considerado como hongo polimórfico, es decir, que se puede presentar en forma levaduriforme, así también en forma filamentosa formando pseudohifas o hifas verdaderas (Figueras et al., 2011); una característica importante que le permite colonizar e invadir tejidos (Staniszewska et al., 2012).

2.3. Hábitat

Las especies de *Candida* son levaduras cosmopolitas ya que tienen la capacidad de adaptarse en diferentes medios (Arenas, 2014).

Se encuentran formando parte de la flora normal de piel, tracto gastrointestinal, flora vaginal y boca (Herwald & Kumamoto, 2014).

En la Figura 1 se observa la distribución de las especies de *Candida* varía de acuerdo a la población de pacientes y características de las casas de salud que se estén estudiando, sin embargo se ha demostrado que *Candida parapsilosis* es una especie predominante en América Latina, Europa, Australia, Asia y África, mientras que en Estados Unidos la mayor frecuencia de aislamientos es de *Candida glabrata* (Marcos, 2013).

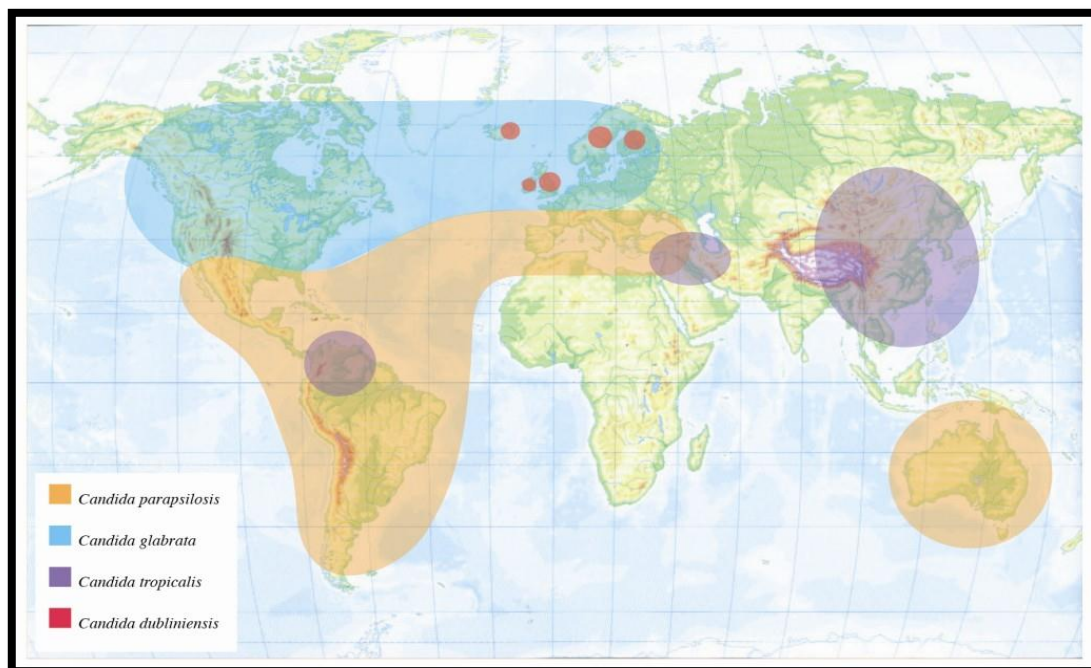


Figura 1 Distribución mundial de especies de *Candida*. Fuente: Marcos, C. (2013). Candidemia: la importancia médica de los cambios en su etiología y epidemiología. Retrieved from <http://www.ehu.es/ehusfera/mikrobios/2013/07/17/candidemia-la-importancia-medica-de-los-cambios-en-su-etilogia-y-epidemiologia-xxiv-congreso-de-microbiologia-sem-lhospitalet-barcelona-julio-2013/>

2.4. Características microbiológicas de *Candida*

Las condiciones del medio de cultivo para que el crecimiento de las especies del género *Candida* sea favorable dependen del pH del medio de cultivo el cual debe ser alcalino (5-6) y contener altas concentraciones de glucosa, además es fundamental la adición de antibióticos como cloranfenicol para evitar la contaminación con bacterias (Pérez et al., 2011). Crecen a temperaturas de 25- 37 °C en un período de 24-36 horas (Tanaka, 2012) (Jiménez Aguiló, 2015) y se observan macroscópicamente colonias blancas, lisas y cremosas.

Microscópicamente se observan blastoconidios, clamidosporas, hifas y pseudohifas, dichas estructuras son de gran importancia para identificar las especies del género *Candida*. *Candida albicans* al ser una levadura pleomórfica (Staniszewska et al., 2012) que bajo óptimas condiciones crece en forma de blastospora (forma unicelular), hifa (miceliar),

pseudohifal (pseudomicelio), además presenta clamidosporas que son esporas de paredes gruesas, éstas últimas ayudan a sobrevivir a *Candida albicans* en ambientes desfavorables (Da Silva et al., 2015).

2.5. Características metabólicas

Para las especies de *Candida* es fundamental la capacidad de adaptación al medio para consumir nutrientes del huésped que ayuden a la supervivencia y división celular, siendo el metabolismo parte importante para su patogenicidad (Han et al., 2012). Su crecimiento y multiplicación depende de la asimilación de hidratos de carbono; una vez atravesada la barrera primaria *Candida* utiliza el ciclo del ácido tricarboxílico para invadir mucosas y mediante gluconeogénesis llegan al torrente sanguíneo. (Brown et al., 2014)

2.6. Características genéticas

Candida albicans posee un genoma de 16-Mb haploides distribuidos en 8 cromosomas diploides (Selmecki, Forche, & Berman, 2010), por otro lado el tamaño del genoma de *C. glabrata* es de 12,3-Mb posee 13 cromosomas y aproximadamente 493 codones. (Ahmad et al., 2014). El genoma de *C. parapsilosis* tiene una longitud de 20.48 Kpb (Inglis et al., 2012).

2.7. Factores de virulencia

Candida spp. presenta algunas características que pueden aportar a su patogenicidad, entre las que se menciona a continuación:

2.7.1. Capacidad de adhesión a tejidos

Para mantener la relación de comensal, es importante la adhesión a las células del hospedador (Murray et al., 2013). Todas las especies del género *Candida* tienen una

relación directa de acuerdo con el nivel de virulencia que presenta, según lo manifiesta Murray y colaboradores (Murray et al., 2013) . La adhesión es un proceso que requiere de fuerzas pasivas como interacciones hidrófobas o fuerzas de Van der Waals lo que permite el contacto célula-célula (Moyes, Richardson, & Naglik, 2015).

Entre las principales adhesinas se encuentran la secuencia tipo aglutinina (ALS) en la que constan ocho proteínas (ALS1-7 y ALS9), de las cuales la adhesina ALS3 es de suma importancia en la expresión de genes de adhesión.(Mayer, Wilson, & Hube, 2013).

2.7.2. Dimorfismo levadura micelio

También denominado morfogénesis, el cambio de levadura a hifa es una de las características importantes para que pueda expresar su patogenicidad (Mayer et al., 2013).

C. albicans tiene la capacidad de cambiar su morfología de levadura a hifa y pseudohifa. Su forma de levadura le permite fijarse a las células endoteliales y así llegar al torrente sanguíneo (Naglik et al., 2014)

Su cambio morfológico está correlacionado a la densidad celular, ya que si es menor de 10^6 células/mm habrá crecimiento de hifas (De la Calle Rodríguez, Santa Vélez, & Cardona Castro, 2012), su forma filamentosa depende también de la superficie a la que se una; si es a células del hospedero o superficies abióticas se activarán EFG1, Ras 1, CPH1 y CYR1 (genes responsables de la filamentación) bajo una nutrición limitada, niveles bajos de oxígeno y peptidoglucanos bacterianos presentes en suero humano ayudarán al desarrollo de hifas. La forma filamentosa ayuda a *Candida* a eludir a los fagocitos y evadir los vasos sanguíneos. (Shareck, Nantel, & Belhumeur, 2011)

2.7.3. Hidrofobicidad a la superficie celular

El nivel de glucosilación de las manoproteínas de la superficie celular de *Candida* afecta significativamente en la hidrofobicidad de las células al eliminar fosfolipomanano (PM) por delección del gen MNN4 (Hall & Gow, 2013) influyendo así en la adhesión a células epiteliales. Los tubos germinales que presenta *C. albicans* son hidrófobos, por otro lado, los blastoconidios son hidrófilos. (Murray et al., 2013)

2.7.4. Secreción de proteinasas

La enzima aspartilproteinasa (SAPs) pertenece al grupo de enzimas degradativas que bien pueden ser secretadas por algunas especies del género *Candida* o pueden estar unidas a la pared celular (Paniagua et al., 2010), su función es hidrolizar proteínas secretadas por el hospedero frente a una infección, entre ellas el colágeno, mucina, fibronectina, inmunoglobulinas, entre otras; atravesando así las barreras del tejido conjuntivo, facilitando la colonización en invasión en los tejidos. (De la Calle Rodríguez et al., 2012)

Así también, las especies patógenas del género *Candida* secretan fosfolipasas las cuales dañan las membranas de las células en mayor proporción *C. albicans*, mientras que especies de *Candida no albicans* en menor proporción. (Rossoni et al., 2013)

Todas las especies de *Candida* presentan los factores de virulencia nombradas anteriormente a excepción de *Candida glabrata* ya que al no poseer hifas ni pseudohifas se convierte en una especie menos patógena para el organismo, sin embargo en personas inmunodeprimidas existe una rápida diseminación (Chakrabarti, 2015).

2.8. Dinámica entre *Candida* y el huésped

Candida es uno de los microorganismos que son capaces de colonizar piel, mucosas gastrointestinales, aparato respiratorio y genitourinario (Zelante et al., 2013), no obstante, la presencia de *Candida* en órganos y aparatos mencionados anteriormente implican la presencia de una infección. Para que un organismo colonice o invada mucosas dependerá del estado de respuesta inmune del huésped (Calderone & Cornelius, 2011).

Las proteínas salivares (lactoferrina, mucinas, lactoperoxidasa, lisozimas, inmunoglobulinas A y transferrina) actúan como mecanismos de defensa para impedir el crecimiento y la adhesión de *Candida* en cavidad orofaríngea (Oncul, Karakis, & Dogruman Al, 2015). El papel que desempeña la mucosa de la cavidad oral es importante en cuanto a la defensa del huésped contra *Candida*, además cuenta con la ayuda de las células epiteliales, las cuales en presencia de un aumento de colonias de *Candida* secretan IL-8 y factores estimulantes de células granulocíticas, mientras que la presencia de inmunoglobulina E y de linfocitos Th 17 defienden la integridad de la mucosa. (Garcia-Vidal & Carratalá, 2012)

2.9. Candidiasis mucocutánea

Infección sintomática que afecta frecuentemente a uñas, piel y mucosas principalmente a la cavidad oral y al conducto vaginal (Puel et al., 2012). La candidiasis oral es más frecuente de las candidiasis mucocutáneas afectando al 53% de la población general (Coronado et al., 2013), se presenta en personas de todas las edades siendo más grave en edades extremas de la vida. Se observa placas blancas alrededor de la cavidad bucal y extendida sobre la lengua, esta enfermedad se puede producir por factores como sistema inmunitario bajo, edades extremas de la vida, prótesis dentales, terapia extensa con antibióticos, inadecuada higiene oral, entre otras causas (Al Attas & Amro, 2010). Para dar

un diagnóstico se revisa microscópicamente el exudado del paciente, el cual si es positivo se observan pseudohifas y blastoconidios. (Palacios, Gómez, & Cardona, 2010)

2.10. Candidiasis cutánea

Enfermedad encontrada principalmente en recién nacidos durante el nacimiento, debido que el 25% de mujeres embarazadas presentan *C. albicans* en la flora genital (Jagtap, Saple, & Dhaliat, 2011), éste tipo de micosis se caracteriza por la presencia de pústulas, ampollas, exantema, con frecuencia también se observan aftas en la boca del recién nacido (El Ahmed et al., 2012). Entre los factores predisponentes se encuentran exposición al calor, humedad, maceración de piel y enfermedades como diabetes y obesidad. (Palacios et al., 2010).

2.11. Candidiasis del aparato urinario

La infección al aparato genitourinario empieza desde la colonización asintomática en vejiga hasta la formación de abscesos renales a causa de la propagación hematógica (Murray et al., 2013). Este tipo de candidiasis se observa con frecuencia en pacientes de sexo femenino con sonda vesical permanente, hospitalización prolongada, antecedentes de cirugías en aparato urinario, diabetes mellitus, entre otras. (Fisher, Sobel, Kauffman, & Newman, 2011)

2.12. Candidiasis invasiva

Es un tipo de infección en el que las levaduras de *Candida* se encuentran en el torrente sanguíneo, no se han establecido características clínicas que permitan diagnosticar ésta infección, así mismo no se puede dar un tratamiento antifúngico específico al paciente. (Consejo de Salubridad General, 2009)

2.12.1. Factores predisponentes del huésped para desarrollar candidiasis invasiva

El riesgo de padecer infecciones aumenta en neonatos prematuros y lactantes, ya que su sistema inmunológico y microflora se encuentra poco desarrollado. (Díaz & Garcés, 2012)

Los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos que no son inmunodeprimidos frecuentemente están conectados a sondas vesicales, reciben nutrición por vía parental y se encuentran en tratamiento con antibióticos de amplio espectro; éstos son factores que predisponen al paciente a contraer algún tipo de infección micótica. (Figueras et al., 2011)

2.13. Candidiasis diseminada

Es una enfermedad rara, que generalmente se presenta en personas con neutropenia o por rechazo agudo a algún órgano trasplantado donde desarrolla candidiasis sistémica invadiendo todo el cuerpo y aparece en la fase terminal del paciente. (Aguado, Ruiz camps, et al., 2011)

2.14. Endocarditis

Presente en mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos con válvulas protésicas, catéteres parentales, pacientes con historial de cirugía abdominal, uso de antibióticos de amplio espectro o antecedente de cirugía abdominal. (Romero et al., 2013)

2.15. Métodos diagnósticos

Las diferentes especies del género *Candida* se pueden identificar usando métodos sencillos o complejos, las técnicas más utilizadas son:

2.15.1. Estudios morfológicos

- **Examinación microscópica directa:** se realiza con una solución de hidróxido de potasio de 5-20 %, asimila relativamente proteínas, lípidos y otros componentes que se encuentran en los remanentes de células. (Schachner & Hansen, 2011)

La tinción con azul de lactofenol es útil para contrastar estructuras fúngicas, así también para observar de mejor manera la morfología, entre ellas la presencia de blastosporas, pseudohifas, hifas. (Murray et al., 2013)

- **Producción de tubo germinal:** reportado por primera vez en 1956 por Reynold & Braude; es una prueba micológica para la presuntiva identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, su principio se basa en la formación de tubo germinal al incubar una muestra de la cepa en un pool de suero a 37 °C por dos horas (Deorukhkar, Saini, & Jadhav, 2012). No son septados y son cortos, solo del 95-97% de especies de *C. albicans* producen tubo germinal. (Dhurba, 2015)

El suero humano aporta un medio rico en nutrientes, vitaminas, hidratos de carbono, factores de crecimiento y aminoácidos (Gil-Loyzaga, 2011), apto para el desarrollo de la extensión filamentosa propia de *Candida albicans* de manera rápida. (Duarte, Márquez, Araujo, & Pérez, 2009)

2.15.2. Medios de Cultivo

- **Agar Mycosel:** es un medio altamente selectivo contiene antibióticos como cicloheximida y cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano, es muy útil para el aislamiento de hongos de muestras con flora mixta (Montúfar-Andrade et al., 2015).

- **Agar Sabouraud:** es un medio útil para el cultivo de dermatofitos, hongos patógenos y no patógenos, contiene un pH ácido de 5,6 ideal para el crecimiento de hongos e impedir el crecimiento de bacterias. Contiene caseína y tejido animal digeridos suplementados con glucosa. (Murray et al., 2013)

- **Agar Harina de Maíz – Tween 80:** útil para observación de micromorfología de especies de *Candida* (Alfonso et al., 2010). Es un medio de cultivo recomendado para observación de clamidosporas, característica propia de *C. albicans*, la adición de tween 80 estimula una producción más rápida de clamidosporas. (Himedia, 2015)

- **CHROMagar® *Candida* Medium:** es un medio selectivo de aislamiento e identificación de especies de *Candida*, que se reconocen por el color que obtienen al crecer en el medio (Ayats et al., 2011), se ha comprobado que la sensibilidad y especificidad de los medios cromogénicos, especialmente de CHROMagar® es del 99%, este medio es selectivo y utiliza sustratos cromógenos como X-NAG (5-bromo-4-cloro-3-indol-N-acetil β D-glucosaminidasa) la cual detecta la enzima hexosaminidasa que se encuentra en la estructura de *C. tropicalis* y *C. albicans* / *C. dubliniensis* y el cromógeno BCIP (5-bromo-6-cloro-3-indolfosfatasa alcalina) presente en *C. krusei* (Alfonso et al., 2010)

2.15.3. Estudio bioquímico

- **Auxonograma:** se basa en la asimilación de azúcares (glucosa, xilosa, adonitol, galactosa, inositol, sorbitol, celobiosa, lactosa, maltosa, trehalosa, rafinosa y ácido láctico) como única fuente de carbono, además de la asimilación de nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno. (Gusiniano, 2009) (Lobaina et al., 2010)

- **Zimograma:** es un medio líquido al que se le añade diferentes azúcares (glucosa, maltosa, trehalosa, galactosa, lactosa, xilosa) además de un indicador de color, el mismo que si cambia y se observa la presencia de burbujas en la campana de Durham debido a la degradación anaeróbica, la fermentación de azúcares es positivo (Antonio, 2012)

2.15.4. Pruebas rápidas de identificación

Dentro de éste grupo se encuentra el API 32C, es un conjunto de pruebas bioquímicas que permite determinar la capacidad de *Candida* para asimilar carbohidratos. Es considerado como prueba gold standard de identificación ya que cuenta con una amplia gama de pruebas de asimilación de carbohidratos evitando así el uso del microscopio. (Estrada Barraza et al., 2011)

2.15.5. Métodos automatizados

Existe una variedad de métodos automatizados que ofrecen rapidez en cuanto a resultados, entre ellos se encuentran *Rapid Yeast Identification Panel MicroScan*, *Sistema Vitek*, pero su costo es elevado por lo que no todos los laboratorios pueden acceder a su uso (Lobaina et al., 2010). Por otro lado, los métodos automatizados utilizan ensayos de asimilación de carbohidratos además de otras reacciones bioquímicas estandarizadas, el mismo que da un resultado a partir de las 24 a 48 horas comparado con otros métodos (Guillarte, Pardi, & Perrone, 2011).

2.15.6. Métodos inmunológicos

Detección de antígenos y anticuerpos: no existe una prueba aceptada para realizar la prueba de antígenos, siendo la más sensible la detección del manano que es un antígeno polisacárido que se realiza mediante la técnica de ELISA detectando anticuerpos anti-

manano en suero o plasma (BioRad, 2009). Tiene un valor predictivo negativo del 95%, además se conoce que la identificación de anticuerpos anti-manano conduce a un riesgo mayor de padecer candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos; en la población sana y colonizada tienen un elevado porcentaje de anticuerpos anti-manano por lo que se han investigado otros más específicos, para la fase micelial (anti-micelio) y contra antígenos citoplasmáticos (Ayats et al., 2011).

2.15.7. Biología molecular

Es un método muy sensible y específico ya que identifica especies de *Candida* que no pueden observarse en el cultivo, los resultados se analizan evaluando el tamaño correspondiente a las pares de las bases de cada una de las bandas comparando de ésta manera las bandas obtenidas en la amplificación del ADN de las cepas control. (Estrada et al., 2011)

2.16. Antifúngicos utilizados para tratamiento de candidemias

2.16.1. Azoles

Este grupo de fármacos antifúngicos fue el primero en aparecer en el mercado siendo muy cotizado por su amplio espectro de acción y efectos secundarios limitados, sobre todo era muy bien tolerado por los pacientes a quienes se les administraba. (Cuenca-Estrella, 2010)

En cuanto a su mecanismo de acción, actúan inhibiendo la enzima dependiente del citocromo P450 (Díaz & Garcés, 2012), el mismo que es codificado por ERG11 (ergosterol 11, componente de la membrana celular de *Candida*) y juega un papel fundamental en la 14 α desmetilación del lanosterol, siendo éste un paso fundamental en la biosíntesis del ergosterol (MacCallum et al., 2010), al interrumpir éste proceso metabólico se acumulan

2.16.3. Equinocandinas

Son lipopéptidos semi sintéticos modificados, en su estructura química presenta dihidroxi-ornitina, dihidroxi-homotirosina, 4-hidroxi-prolina y 3-hidroxi-4-metilprolina (Cortés & Russi, 2011). Dentro de este grupo se encuentran caspofungina, micafungina y anidulafungina.

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la sintasa 1,3- β -D-glucano con el objetivo de impedir la biosíntesis de dicha enzima que es un componente esencial en la pared celular de *Candida* (Pfaller, 2012)

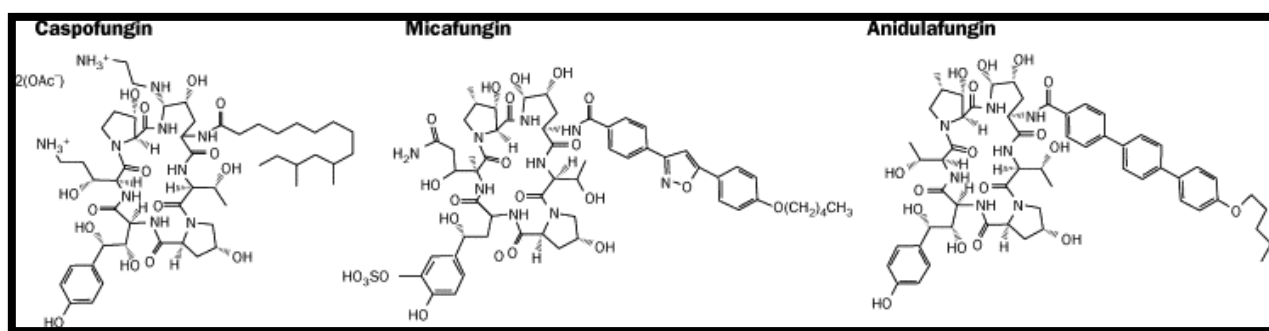


Figura 3 Estructura química de las equinocandinas. Fuente: Kofla, G., & Ruhnke, M. (2011). Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. *European Journal of Medical Research*, 16(4), 159–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486730>

2.17. Mecanismos de resistencia a antifúngicos

Debido a los nuevos fármacos antifúngicos y al cambio de epidemiología de candidemias se han registrado un elevado número de resistencias por especies de *Candida*. (Cortés & Russi, 2011). Los mecanismos de resistencia dependen de las características propias de las especies de *Candida* ya sean intrínsecas o extrínsecas.

La resistencia microbiológica depende de mecanismos innatos en el que todas las cepas son resistentes (*C. krusei* es intrínsecamente resistente a los azoles); primarios, donde la resistencia se presenta antes de la exposición con el fármaco antifúngico y están

estrechamente relacionados con las características intrínsecas de cada especie. (Caldas et al., 2013), por otro lado, los mecanismos de resistencia secundarios el cual se muestra después de haber tenido contacto con el antifúngico (Caldas et al., 2013)

2.18. Resistencia a Azoles

La resistencia en éstas especies se debe principalmente a varios mecanismos: la susceptibilidad reducida o resistencia que se genera mediante bombas de eflujo las cuales son codificadas por genes como MDR o CDR (Romero-Luévano et al., 2014) y tienden a disminuir la concentración de fármaco antifúngico (Pfaller, 2012); mutaciones en el gen codificador de la enzima blanco (ERG11) lo que implica la unión imposible con los azoles (Romero-Luévano et al., 2014), ante la presencia de bombas de eflujo y mutaciones de ergosterol-11, la resistencia a Fluconazol y Voriconazol es mayor generando una capacidad casi nula para unirse a los azoles (Pfaller, 2012).

2.19. Resistencia a equinocandinas

Entre los mecanismos utilizados por los microorganismos para generar resistencia se encuentra la respuesta al estrés adaptativo en el cual aumentan los niveles de quitina en la membrana celular con presencia de crecimiento a elevadas concentraciones, mutaciones adquiridas en los genes de Fsk1 y Fsk2 como causantes de resistencia en *C. glabrata*, además de mutaciones intrínsecas en el gen FKS, las mismas que se asocian a *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*. (Beyda, Lewis, & Garey, 2012)

2.20. Resistencia a Polienos

La resistencia a polienos es casi nula, pero se debe a mutaciones en el gen ergosterol 3 en que se evidencia disminución en el número de esteroides perdiendo de ésta manera la afinidad por el antifúngico. (Araujo da Costa & Barbosa Santiago, 2015)

MARCO CONCEPTUAL

Antifungigrama: es una amplia gama de tratamientos o medicamentos los cuales actúan sobre el microorganismo al que se expone. (Castillo Blancarte, 2013)

Causas endócrinas: relacionado con enfermedades producidas por alteraciones del sistema endócrino, debido a desequilibrios hormonales, desembocando en enfermedades comunes como diabetes o raras como acromegalia. (Carrillo & Torres, 2013)

CHROMagar®: es un medio de aislamiento selectivo que se utiliza para el aislamiento e identificación para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. Krusei* las cuales producen una coloración diferente en el medio debido a los sustratos cromógenos que presenta; además puede identificar otra clase de hongos filamentosos. (Sumitra & Maheshwari, 2014)

Concentración mínima inhibitoria: concentración mínima de antifúngico capaz de detener el crecimiento in vitro de ciertos microorganismos. (Quintana, 2013)

Factores predisponentes: sistema inmunitario débil lo cual proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento y propagación del hongo. En este grupo se incluye la edad, así como factores de riesgo metabólicos y fisiológicos. (OMS, 2015)

Levadura: organismo unicelular perteneciente a la familia de blastomicetos. (Nieto, 2011)

Patogenia: mecanismos que ocupa el microorganismo para originar una enfermedad. (Ruiz, 2011)

Resistencia antifúngica: capacidad de los microorganismos para adaptarse a diferentes medios y crecer en presencia de fármacos antifúngicos. (Malbrán, 2015)

Sensibilidad antifúngica: inhibición del crecimiento de un microorganismo por acción de un fármaco. (Quintana, 2013)

Sensible dependiente de la dosis: la sensibilidad es dependiente de la concentración del antimicrobiano (Malbrán, 2013).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de estudio

El trabajo consistió en una investigación de tipo observacional porque no va a existir intervención de ningún tipo, descriptivo para conocer características de las distintas cepas y solo se mide las variables; longitudinal ya que se va a identificar y analizar las especies del género *Candida* del cepario perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública en diferentes períodos de tiempo durante enero 2007 a abril 2016 y por último se clasifica como un estudio mixto o ambispectivo ya que se toman datos del pasado iniciándose el estudio en el presente.

3.2. Población de estudio y muestra

Se trabajó con todas las muestras del cepario de especies del género *Candida* del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública durante el período enero 2007 a abril 2016. Las cepas se eligieron tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

3.3. Criterios de inclusión

- Cepas identificadas como *Candida spp.* del cepario del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.
- Cepas con información completa en cuadernos de registro.

3.4. Criterios de exclusión

- Cepas con datos incompletos en el cuaderno de registro.
- Ausencia de crecimiento en el medio de cultivo.

3.5. Tamaño de la muestra

No existe cálculo de muestra ya que se trabajó con todas las cepas, es decir con el universo de la población.

3.6. MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales

Cultivo e identificación fenotípica de *Candida*

- Agar Sabouraud con cloranfenicol: Acumedia; lote 106458B
- Agar Harina de Maíz:
- CHROMagar®

Conservación de cepas de *Candida*

- Brain Heart Infusion Agar: Oxoid; lote 1567304
- Glicerol

Resistencia antifúngica

- Kit Sensititre Yeastone broth: Thermo Scientific ; lote 658192
- Kit Sensititre Yeastone format: Thermo Scientific; lote B5164

Materiales complementarios de laboratorio

- Mechero bunsen
- Cajas petri plásticas
- Cajas petri de vidrio
- Asas
- Tubos cónicos plásticos de 1,5 mL

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pinzas
- Pipeta 20-200 µL
- Puntas desechables

Reactivos

- Tween 80
- Agua destilada
- Agua estéril
- Suero Humano

Equipos

- Microscopio óptico
- Incubadora 35 °C
- Incubadora 27 °C
- Refrigerador -70 °C
- Vortex
- Medidor de Turbidez

3.7. PROCEDIMIENTO

3.7.1. FASE I

3.7.1.1. Cepas de *Candida spp*

Para la realización del proyecto de investigación se seleccionó 100 cepas de *Candida* obtenidas de muestras clínicas teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión las mismas que se procesaron en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Quito, de diferentes ciudades del país de enero de 2007 a abril 2016.

3.7.2. FASE II

3.7.2.1. Replicación de cepas de *Candida* en Agar Sabouraud

- Se tomó la muestra con un asa estéril de las cepas conservadas en crioviales con BHI + 20% de glicerol y se procedió a sembrar en Agar Sabouraud.
- Seguidamente se incubaron en una incubadora a 27 °C por 48 horas.
- Se aislaron las colonias de *Candida* y se transfirieron a un tubo cónico plástico de 1,5 mL con caldo de BHI + glicerol al 20%, por consiguiente, se preservaron en la congeladora a -70°C.

3.7.2.2. Conservación de muestras

Las cepas obtenidas a las 48 horas se conservaron en BHI + Glicerol al 20%, y posteriormente fueron guardadas en el congelador a -70 °C. **ANEXO I**

3.7.3. FASE III

3.7.3.1. Identificación fenotípica de las especies del género *Candida*

- **Tubo germinal**

Para la identificar la presencia de tubo germinal, se utilizó suero humano normal a 37 °C, observándose la extensión de la levadura sin estrechamiento. **ANEXO II** (Aryal, 2015)

- **Morfología en Agar Harina de Maíz**

La siembra en agar harina de maíz se realiza mediante la técnica de Dalmau evidenciando en la observación microscópica: hifas, blastoconidias y clamidosporas (Kurtzman, Fel, & Boekthout, 2011) . **ANEXO III**

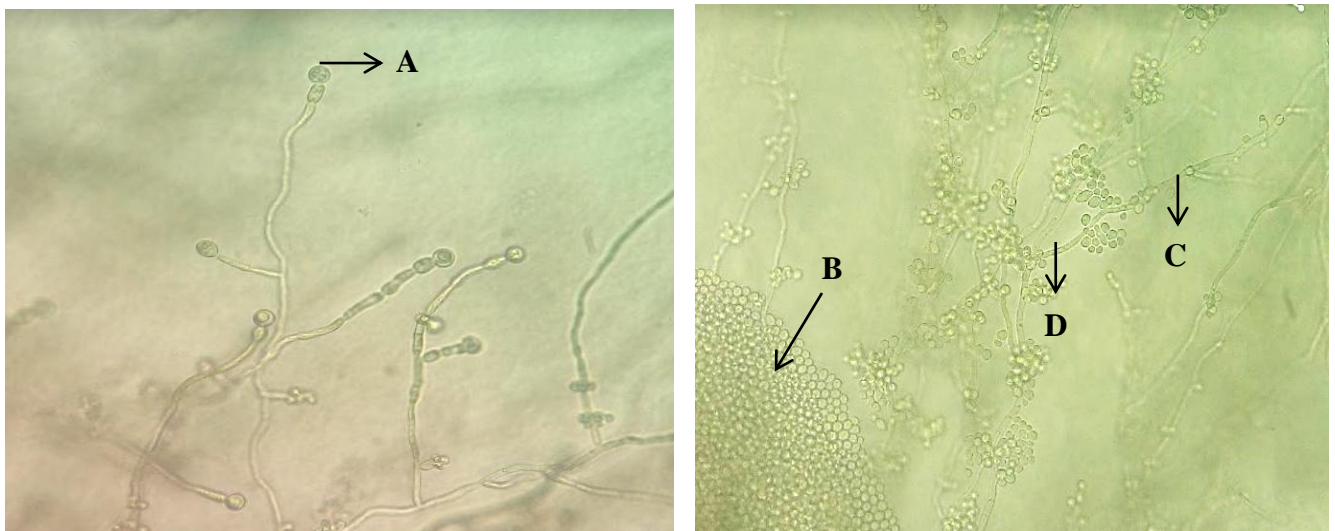


Figura 4. Presencia de clamidosporas en *Candida albicans* y estructura morfológica. A) clamidosporas; B) levaduras; C) blastospora; D) pseudohifa

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

- **CHROMagar®**

Con un asa estéril se tomó una pequeña cantidad de muestra de una colonia aislada en Agar Sabouraud y se inoculó mediante el método de siembra en estría.

Candida albicans dan un color verde claro a mediano, *Candida krusei* varía en un color rosado claro a rosa con un borde blancuzco, *Candida tropicalis* las colonias se tornan de un color gris azulado, Otras especies de *Candida* generan un color que varía entre marrón claro y marrón oscuro. Casa Comercial BD. ANEXO IV

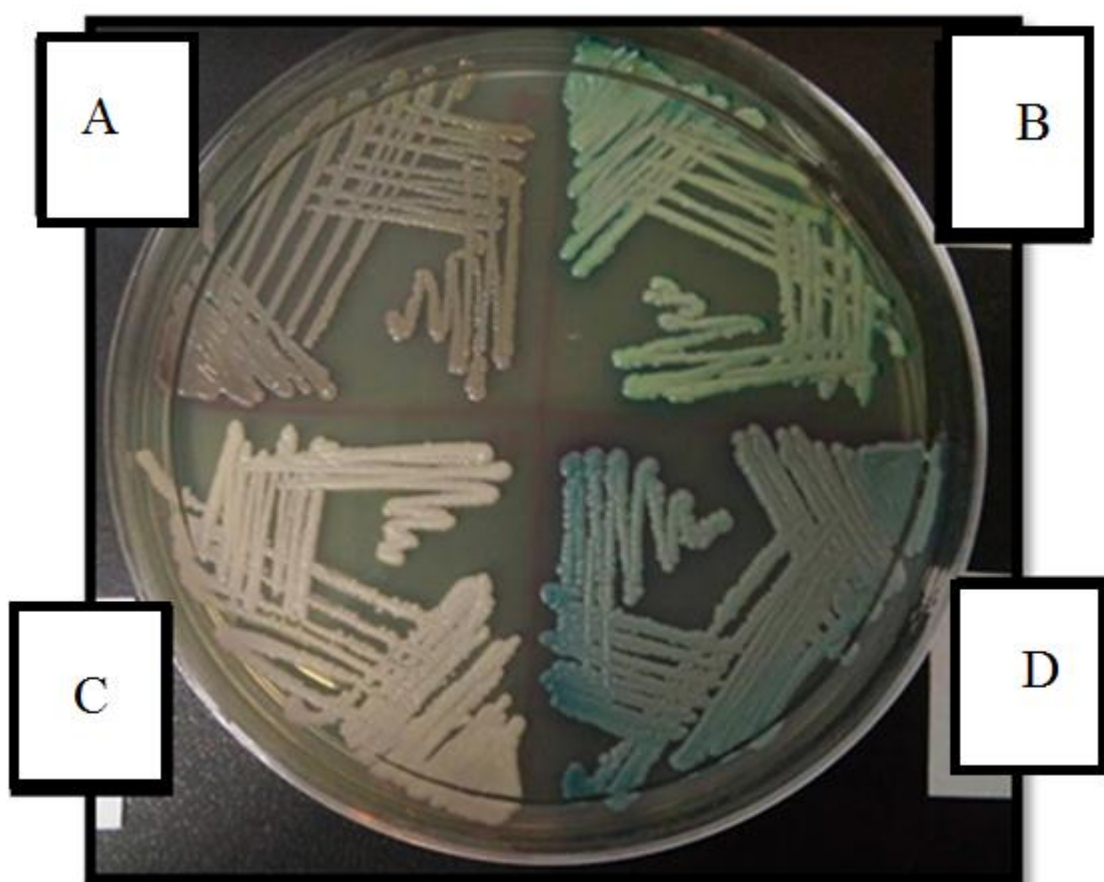


Figura 5. Especies de *Candida* en CHROMagar®. A) *Candida glabrata* B) *Candida albicans* C) *Candida guilliermondii* D) *Candida tropicalis*.

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

3.7.3.2. Identificación bioquímica

Prueba de asimilación y fermentación de azúcares

Se tomaron colonias a partir del agar Sabouraud, y se diluyó en agua estéril hasta llegar al 0,5 de la escala McFarland. Seguidamente, se tomó la suspensión con un asa redonda y se inoculó en los tubos que contenían previamente los hidratos de carbono (glucosa, lactosa, galactosa, maltosa y xilosa) y el indicador; se incubaron a 32°C, así

mismo se realizó la lectura a las 48 horas. El viraje de color del medio fue interpretado como positivo en el caso de asimilación de azúcares o auxonograma, mientras que la presencia de burbujas en la campana de Durham eran sugestivas de fermentación del medio debido a la degradación anaerobia. **ANEXO V**

3.7.4. FASE IV

3.7.4.1. Prueba de resistencia antifúngica

Se eligió 20 cepas de muestras invasivas para determinar la susceptibilidad a los diferentes antifúngicos (anidulafungina, anfotericina B, micafungina, caspofungina, 5-flucitosina, posaconazol, itraconazol, voriconazol y fluconazol), debido a que la tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos que además presentan factores de riesgo es más alta en comparación con pacientes que presentan colonización por *Candida spp.*

El perfil de resistencia se realizó mediante microdilución colorimétrica, los pocillos contienen azul de alamar el cual es el indicador de cambio en el pH del medio, indicando de ésta manera la concentración mínima inhibitoria que presenta la cepa analizada, así mismo con la tabla de interpretación de resultados provista por la casa comercial se identificó la posición del antifúngico y la concentración en la que se observó el primer cambio de color. **ANEXO VI**

3.7.5. FASE V

3.7.5.1. Control de Calidad

El control de calidad se realizó con la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 en Sabouraud observándose las características macroscópicas propias de la cepa; prueba de tubo germinal en suero humano comprobando la formación de la extensión filamentosa de

la levadura y por último en CHROMagar® identificando la validez del medio al observar el color verde característico de *Candida albicans*. **ANEXO IX**

El control de calidad del microcultivo se realizó mediante la comparación de las estructuras observadas microscópicamente con la Micología Médica Ilustrada de Arenas, 2014 e imágenes obtenidas de medios electrónicos.

3.7.5.2. Recolección y análisis de datos

Una vez obtenidos los resultados, se realizó la tabulación de los mismos en el programa informático excel en el cual se calculó la frecuencia representada en porcentaje de acuerdo al n de los datos. Los resultados se presentarán en tablas indicando el n y la frecuencia de cada variable.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Población de estudio

Se analizaron 100 cepas de *Candida* conservadas en BHI + Glicerol al 20% procesadas en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de enero 2007 a abril 2016. Las muestras analizadas procedían de pacientes con infecciones fúngicas locales y sistémicas.

Se estudiaron 45 pacientes del sexo femenino representando el 45% y 55 del sexo masculino constituyendo el 55%, del mismo modo, el estudio abarcó cepas pertenecientes a pacientes menores a un año hasta los 85 años de edad provenientes de diferentes casas de salud del país.

Tabla 1 Epidemiología de cepas de *Candida* obtenidas de casas de Salud del país, 2007-2016.

La tabla que se muestra a continuación describe las características generales de la población estudiada de acuerdo al sexo, edad, casas de salud y frecuencia de muestras donde fueron aisladas las cepas de *Candida*.

SEXO			EDAD			CASAS DE SALUD				TIPO DE MUESTRAS INFECTADAS				
n°	%		n°	%		Lugar de procedencia	n°	%		Mayor # de casos /año		n°	%	
F	45	45	<1	26	26	HOSP. 1/ Quito	53	53	2013(34)	L. Bronquial	29	29		
M	55	55	1-19	31	31	HOSP. 2/ Quito	32	32	2008(23)	Orina	22	22		
			20-50	25	25	HOSP. 3/ Quito	1	1	2008(1)	Sangre	13	13		
			≥50	18	18	HOSP. 4/ Quito	2	2	2010(2)	S. Vaginal	9	9		
						CP 5/ Quito	1	1	2010(1)	Espuito	9	9		
						CS 6/ Quito	1	1	2012(1)	Onicomycosis	4	4		
						CS 7/ Archidona	1	1	2010(1)	L.C.R	2	2		

Continuación de la tabla.

SEXO		EDAD		CASAS DE SALUD			TIPO DE MUESTRAS INFECTADAS			
n°	%	n°	%	Lugar de procedencia	n°	%	Mayor # de casos /año		n°	%
				SCS 8 / Tena	1	1	2008(1)	A. Gástrico	2	2
				OTROS	8	8	2008(4)	Catéter	2	2
							2010(4)	E. glande	1	1
								Ingle	1	1
								Cepa	1	1
								Palma de mano	1	1
								Sonda vesical	1	1
								S. Endotraqueal	1	1
								S. Faríngea	1	1
								S. Herida	1	1

*HOSP: Hospital; CP: Clínica Particular; CS: Centro de Salud; *LCR: Líquido Cefalorraquídeo

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

4.2. Identificación fenotípica de especies de *Candida*

Para la identificación de tubos germinales en suero humano, una vez incubada la muestra a 37 °C se tomó el tiempo y al cabo de 2 horas se procedió a leer resultados.

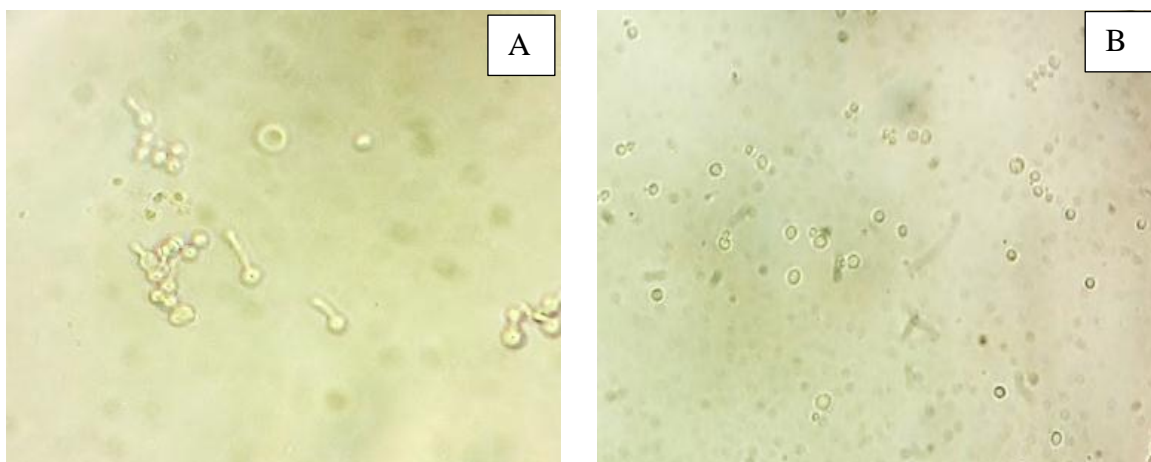


Figura 6 Formación de tubo germinal. A) Tubo germinal positivo B) Tubo germinal negativo

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016



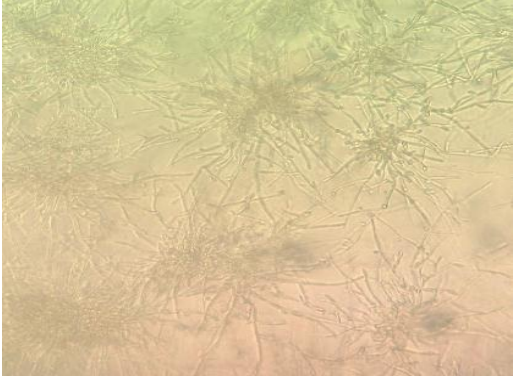
Tabla 2 Características fenotípicas de las especies de *Candida*.- En la tabla se indica el nombre del microorganismo, el número de cepas estudiadas, porcentaje de cepas que crecieron a 27 °C, así mismo tubo germinal, producción de clamidosporas, presencia de hifas/pseudohifas, color y aspecto en CHROMagar®, además la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos que presenta el medio cromogénico ante la identificación de *Candida albicans* y *tropicalis*.

MICROORGANISMO	N	CRECIMIENTO 27 °C n° (%)	TUBO GERMINAL n° (%)	PRODUCCIÓN DE CLAMIDOSPORAS n° (%)	PRESENCIA DE HIFAS/PSEUDOHIFAS n° (%)	COLOR Y ASPECTO EN CHROMagar®	N°				
								S	E	VPP	VPN
<i>C. albicans</i>	60	60 (100,0)	60 (100,0)	60 (100,0)	60 (100,0)	Verde cremosa	57	95%	85%	90%	91%
<i>C. tropicalis</i>	26	26 (100,0)	—	—	26 (100,0)	Azul cremosa / gris azulado	7	26,9%	97%	77%	79%
<i>C. guilliermondii</i>	4	4 (100,0)	—	—	4 (100,0)	Marrón claro/oscurο					
<i>C. glabrata</i>	7	7 (100,0)	—	—	—	Marrón claro/oscurο					
<i>C. parapsilosis</i>	1	1 (100,0)	—	—	1 (100,0)	Marrón claro/oscurο					
<i>C. lusitaniae</i>	1	1 (100,0)	—	—	1 (100,0)	Marrón claro/oscurο					

*S: Sensibilidad; E: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN Valor predictivo negativo

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

Tabla 3 Morfología de las especies de *Candida* en Agar Harina de Maíz con Tween 80.- La tabla muestra las características morfológicas de cada especie, evidenciando con fotografías.

Microorganismo	Características micro-morfológicas	Fotografías
<i>C. albicans</i>	<p>Presencia de pseudohifas</p> <p>Clamidoporas en el extremo terminal de la pseudohifa</p> <p>Blastoconidios</p>	
<i>C. tropicalis</i>	<p>Blastoconidios distribuidos en la pseudohifa</p>	
<i>C. guilliermondii</i>	<p>Pseudohifas cortas</p> <p>Blastoconidios distribuidos a manera de racimo</p>	

C. glabrata

Únicamente posee blastoconidios
frecuentemente agrupados

No presenta pseudohifas



C. parapsilosis

Presencia de blastoconidios a lo
largo de la pseudohifa

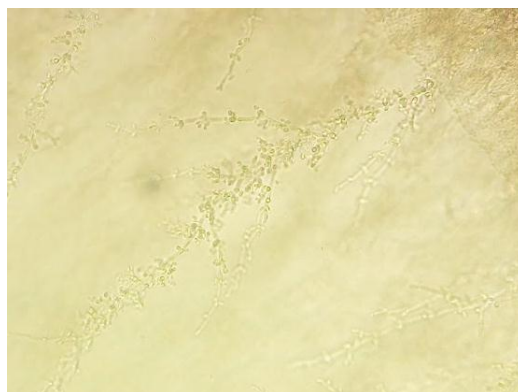
Presenta micelio de células grandes.



C. lusitaniae

Pseudohifa curvada

Presenta blastoconidios alargados en
series cortas



ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

Los resultados obtenidos del total de las cepas analizadas se encuentran detallados en el **ANEXO X**, además los resultados en CHROMagar® se muestran en el **ANEXO XI**

Tabla 4 Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas invasivas. - En la tabla se exhibe los resultados de pruebas bioquímicas; asimilación de carbohidratos (auxonograma) y fermentación de azúcares (zimograma) ante glucosa lactosa, maltosa, galactosa y sacarosa

	N°	AUXONOGRAMA					ZIMOGRAMA				
		Glucosa	Lactosa	Maltosa	Galactosa	Sacarosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Galactosa	Sacarosa
<i>C. albicans</i>	4	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+/-
<i>C. tropicalis</i>	10	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	3	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1	+	-	+	+	+	V	-	+	V	-
<i>C. lusitaniae</i>	1	+	V	+	V	+	+	V	-	V	-

*V: variable, +: positivo; -: negativo

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

5.1. Perfil de resistencia de cepas de *Candida* CLSI - EUCAST

Tabla 5 Susceptibilidad a los azoles de primera y segunda generación de acuerdo a puntos de corte establecidos en CLSI, 2008. La tabla indica la interpretación de susceptibilidad por concentración mínima inhibitoria ante Fluconazol, Itraconazol y Voriconazol.

Especie	Fluconazol		Itraconazol			Voriconazol		
	S	R	S	S.D.D	R	S	S.D.D	R
<i>C. albicans</i>	4 (100%)	—	4 (100%)	—	—	4 (100%)	—	—
<i>C. tropicalis</i>	10 (100%)	—	8 (80%)	2 (20%)	—	10 (100%)	—	—
<i>C. guilliermondii</i>	3 (100%)	—	3 (100%)	—	—	3 (100%)	—	—
<i>C. glabrata</i>	—	1 (100%)	—	—	1 (100%)	—	1(100%)	—
<i>C. parapsilosis</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	—	1 (100%)	—	—
<i>C. lusitaniae</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	—	1 (100%)	—	—
TOTAL	19	1	17	2	1	19	1	

S (Sensible) R (Resistente) S.D.D (Sensible dosis dependiente)

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

Tabla 6 Susceptibilidad a los azoles de primera y segunda generación de acuerdo a puntos de corte establecidos en EUCAST, 2015. La tabla refiere la interpretación de concentración mínima inhibitoria de puntos de corte instituidos en EUCAST, 2015 ante Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol y Posaconazol.

Especie	Fluconazol		Itraconazol		Voriconazol		Posaconazol	
	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>C. albicans</i>	4 (100%)	—	4 (100%)	—	4 (100%)	—	4(100%)	—
<i>C. tropicalis</i>	10 (100%)	—	8 (80%)	2 (20%)	10 (100%)	—	10 (100%)	—
<i>C. guilliermondii</i>	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
<i>C. glabrata</i>	—	1 (100%)	IE	IE	IE	IE	IE	IE
<i>C. parapsilosis</i>	—	1 (100%)	1 (100%)	—	1(100%)	—	1(100%)	—
<i>C. lusitaniae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
TOTAL	14	2	13	2	15		15	

S (Sensible) R (Resistente) / IE: No hay pruebas suficientes de que la especie en cuestión es un buen objetivo para la terapia con el fármaco.

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

Tabla 7 Susceptibilidad a las equinocandinas de acuerdo a puntos de corte establecidos por CLSI, 2008. En la tabla se muestra el perfil de resistencia que muestran las especies de *Candida* ante Anidulafungina, Caspofungina y Micafungina.

Especie	Anidulafungina		Caspofungina		Micafungina		
	S	R	S	R	S	N.S	R
<i>C. albicans</i>	4 (100%)	—	4 (100%)	—	4 (100%)	—	—
<i>C. tropicalis</i>	10 (100%)	—	10 (100%)	—	9 (90%)	1(10%)	—
<i>C. guilliermondii</i>	3 (100%)	—	3 (100%)	—	3 (100%)	—	—
<i>C. glabrata</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	1(100%)		—
<i>C. parapsilosis</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	1 (100%)	—	—
<i>C. lusitaniae</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	1 (100%)	—	—
TOTAL	20		20		19	1	

S (Sensible) R (Resistente) N.S (No sensible)
ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

Tabla 8 Susceptibilidad a las equinocandinas de acuerdo a puntos de corte establecidos por EUCAST, 2015. La tabla indica la resistencia que presentan las especies de *Candida* a Anidulafungina, Micafungina y Anfotericina B, de acuerdo a puntos de corte establecidos en EUCAST, 2015

Especie	Anidulafungina		Micafungina		Anfotericina B	
	S	R	S	R	S	R
<i>C. albicans</i>	4 (100%)	—	4 (100%)	—	4 (100%)	—
<i>C. tropicalis</i>	3 (30%)	7(70%)	IE	—	10 (100%)	—
<i>C. guilliermondii</i>	IE	IE	IE	IE	IE	IE
<i>C. glabrata</i>	1 (100%)	—	1 (100%)	—	1(100%)	—
<i>C. parapsilosis</i>	1 (100%)	—	*	—	1 (100%)	—
<i>C. lusitaniae</i>	*	*	*	*	*	*
TOTAL	9	7	5		16	

S (Sensible) R (Resistente) / * punto de corte no establecido / IE: No hay pruebas suficientes de que la especie en cuestión es un buen objetivo para la terapia con el fármaco.

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* se presentan en el ser humano como parte de la flora microbiológica normal (Herwald & Kumamoto, 2014), sin embargo en condiciones de inmunosupresión puede llegar a colonizar mucosas e invadir el torrente sanguíneo convirtiéndose de levadura comensal en patógena.

El presente trabajo muestra pruebas para identificación fenotípica y de susceptibilidad antifúngica. Para lo cual se analizaron 100 cepas provenientes de diferentes muestras, teniendo la mayor prevalencia de casos en muestras de lavado bronquial.

Las pruebas convencionales para identificación de especies son fundamentales en el laboratorio, además de ser accesibles y rápidos en cuanto a resultados. Tanto el Agar Sabouraud y Agar Harina de Maíz ayudan a la identificación macroscópica como microscópica de las especies de *Candida* resultando muy útiles para identificar sus estructuras y determinar la especie, de la misma manera el estudio realizado por Golia y colaboradores indica que el uso de Agar Harina de Maíz ayuda a determinar las especies *albicans* de las *no albicans* de manera muy fácil ayudando en el diagnóstico presuntivo de las especies de *Candida* en el laboratorio (Golia et al., 2013).

El cultivo en CHROMagar® a pesar de ser un método práctico y sencillo para la identificación de especies, no es útil en la práctica clínica, ya que de las 15 especies causantes de candidemia solo es capaz de identificar 4. En éste estudio se obtuvo una alta sensibilidad para identificar especies de *Candida albicans* (95%), mientras que la sensibilidad fue baja para la identificación de especie de *Candida tropicalis* con un 26%, sin embargo su especificidad fue de 97% en el análisis de las muestras, éstos valores se relacionan a los obtenidos por (Alfonso et al., 2010) donde obtuvieron una sensibilidad

para *Candida albicans* de 98,1%, mientras que se demostró una gran diferencia con el valor de sensibilidad de *Candida tropicalis* ya que fue de 67,6%; por otro lado también se comparó con datos de sensibilidad y especificidad obtenidos en el estudio de Sumitra y Maheshwari en el cual la sensibilidad para detectar especies de *Candida* mediante agar cromado fue del 100% y una especificidad del 96%, de la misma manera, para *Candida tropicalis* se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. (Sumitra & Maheshwari, 2014)

En el análisis de los resultados expuestos anteriormente se obtuvieron además valores predictivos que evalúan la prueba diagnóstica en una población determinada; para *Candida albicans* el valor predictivo positivo fue del 90%, es así que éste medio dará el color verde característico en el 90% de cepas de *Candida albicans*, mientras que para *Candida tropicalis* fue menor, 77%, es decir, que en el 77% de cepas de *Candida tropicalis* la colonia se tornará de color gris-azulada. Para lo cual podemos decir que *Candida tropicalis* presentan una diferencia significativa en cuanto a sensibilidad demostrando en el presente estudio que el agar cromogénico para *Candida* es útil solo para diferenciar cepas de *Candida albicans* de las *no-albicans*, resultados que concuerdan con el estudio realizado por Estrada-Barraza 2011, donde confirma falsos resultados al identificar *Candida tropicalis* al utilizar el medio cromogénico. (Estrada Barraza et al., 2011)

De las muestras obtenidas el 53% de aislamientos provienen de un hospital pediátrico, demostrándose así un factor de riesgo importante como lo menciona Santolaya y colaboradores, afirmando que los neonatos nacidos prematuramente no cuentan con un sistema inmunológico maduro, por ésta razón el personal médico debe intervenir al infante a tratamientos agresivos como la exposición a Anfotericina B deoxicolato ya que presenta efectos nefrotóxicos (Santolaya et al., 2013), aumentando los factores de riesgo como uso

de catéter venoso central, nutrición parenteral, uso de medicamentos de amplio espectro, entre otros, volviéndose aún más vulnerable (Nucci et al., 2013).

En el Ecuador durante el año 2013, se refleja una mayor cantidad de aislamientos de cepas de *Candida*, las mismas que se aislaron con mayor frecuencia en muestras de orina. Estos resultados se corroboran con el estudio de Izquierdo 2014, en el que se menciona que es común aislar especies de *Candida* en muestras de orina mediante punción suprapúbica (Izquierdo et al., 2014). En cuanto a su importancia clínica, Heras y colaboradores 2015, mencionan que ante un aislado de *Candida* en muestras de orina, es fundamental determinar si procede de una colonización o infección, tomando en cuenta la sintomatología del paciente y el número significativo de colonias que se presente en el medio de cultivo, seguidamente del proceso de identificación de la especie. (Heras Cañas et al., 2015)

Estudios realizados por Díaz y Garcés 2012, mencionan que los pacientes pediátricos eliminan el Fluconazol de forma más rápida que los adultos, disminuyendo la vida media del medicamento y obligado al médico a aumentar las dosis, es así que existen dos cepas de *Candida tropicalis* con un MIC de 0,25 µg/mL, y una cepa de *Candida glabrata* con un MIC de 2 µg/mL susceptibles a dosis dependiente a Itraconazol y Voriconazol correspondientemente, a las que se debe tratar con medicamentos con concentraciones más altas para tener el efecto esperado (Díaz & Garcés, 2012). Resultados similares se reportaron en el estudio realizado por Ortigoza y Arroyo 2014, donde el 64,1% de cepas de *Candida tropicalis* fueron sensibles a dosis dependiente a Itraconazol y el 4,8% de *Candida glabrata* también fueron sensibles a dosis dependiente con Voriconazol (Ortigoza-Medrano & Arroyo-Espinosa, 2014), estos datos también se corroboran con la investigación realizada por Morales y colaboradores 2013, donde se reportó que el 33,3%

de aislamientos de *Candida glabrata* fueron sensibles a dosis dependiente en Voriconazol (Morales et al., 2013).

Las especies de *Candida no albicans* se encontraron aislados en mayor frecuencia a partir del año 2012 hasta el 2016, datos que se corroboran con el estudio de Alburquerque y colaboradores 2013, donde afirma que el aumento de especies diferentes de *Candida albicans* se evidencia a nivel nacional e internacional, demostrando que las especies *no-albicans* presentan mayor resistencia a antifúngicos (Alburquerque et al., 2013).

Los datos también demuestran que el segundo microorganismo más aislado pertenece a *Candida tropicalis* en un 26% dentro del grupo de *Candida no albicans*; dato que coincide con el estudio realizado por Kothavade y colaboradores 2010, donde se menciona que las infecciones producidas *Candida tropicalis* han aumentado a nivel mundial, además puede ser más patógeno en pacientes oncológicos comparado con *Candida albicans*. (Kothavade et al., 2010)

Se consideró a las cepas invasivas para realizar pruebas de susceptibilidad, ya que por provenir de pacientes vulnerables es importante conocer si existía o no resistencia a los antifúngicos expuestos. (Odio, 2010)

El método de microdilución colorimétrica usando el kit Sensititre YeastOne para levaduras demostró ser una prueba rápida para determinar perfiles de susceptibilidad antifúngica, en la interpretación se observó el fenómeno de Eagle (crecimiento paradójico a concentraciones altas del antifúngico) el mismo que se indica previamente en la técnica destacando que es usual encontrar Itraconazol, sin embargo los resultados obtenidos en el estudio, reportan éste fenómeno en Pozaconazol en una cepa de *Candida tropicalis*, y una cepa de *Candida glabrata*; además se observó en Fluconazol en una cepa de *Candida glabrata* y por último en una cepa de *Candida albicans* se observó el fenómeno de Eagle

en Voriconazol y 5-Flucitosina. En una publicación realizada por Tzar y colaboradores 2013, mencionan que éste efecto se produce principalmente en equinocandinas, en especial en Caspofungina, no obstante no se reporta éste efecto con el grupo de los azoles.(Tzar et al., 2013)

Las investigaciones que se realizan a cerca de resistencia antifúngica son limitadas y la mayor parte de ellas sesgan la información para algunas poblaciones de pacientes, siendo así, que en países en vías de desarrollo no se realizan pruebas de susceptibilidad antifúngica debido al costo que les representa incrementando así el riesgo de resistencias a antifúngicos de primera línea (World Healt Organization, 2014).

Actualmente para el tratamiento y profilaxis de infecciones fúngicas se usa de forma indiscriminada Fluconazol, lo que ha conllevado al aumento de especies de *Candida no albicans*, influyendo directamente en a la resistencia a fármacos antifúngicos. (Aguado, Ruiz-Camps, et al., 2011) como se describe en la publicación realizada en el 2010 por Cuenca, que el uso prolongado de antimicrobianos genera como efecto secundario la resistencia a fármacos antifúngicos.(Cuenca-Estrella, 2010)

En cuanto a *Candida albicans* no se encontró ningún patrón de resistencia a antifúngicos, datos que se confirman en el reporte publicado por World Health Organization 2014, en el que se menciona que en Ecuador la especie *Candida albicans* no presenta ningún tipo de resistencia a Fluconazol, por otro lado la resistencia a éste antifúngico es más frecuente en especies *no albicans* (World Healt Organization, 2014); sin embargo, en el estudio realizado en América Latina por Nucci y colaboradores 2013, se identificó sensibilidad a dosis dependiente en Fluconazol en una cepa de *Candida albicans* la cual representaba el 0,4% del total de las cepas estudiadas (Nucci et al., 2013).

Se observó que todas las cepas estudiadas son sensibles a Anidulafungina, Anfotericina B, Posaconazol y Caspofungina, resultados que coinciden con la investigación de Aburquenque y colaboradores 2011, donde se expone la sensibilidad de especies de *Candida* especialmente por Anidulafungina considerándola como tratamiento eficaz para candidemias inclusive si éstas presentan resistencia a Fluconazol (Alburquenque et al., 2011); por otro lado el 20% de *C. tropicalis* son sensibles a dosis dependiente de Itraconazol, no obstante en la literatura se describe sensibilidad a dosis dependiente a azoles en *C. albicans* (García-Agudo & García-Martos, 2012)

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Candida glabrata* es resistente a Fluconazol (MIC 64 µg/mL), Itraconazol (MIC 8 µg/mL) y sensible a dosis dependiente a Voriconazol (MIC 2 µg/mL); dichos resultados se correlacionan con los datos obtenidos en la investigación de Aguado, José María y colaboradores 2011, donde mencionan que existe un aumento de *Candida glabrata* y *Candida krusei* resistentes al Fluconazol (Aguado et al., 2011), además en el estudio realizado por Ortigoza 2014, indica que *Candida glabrata* posee resistencia secundaria al Fluconazol la cual se produce tras ser expuesto previamente al antifúngico (Ortigoza et al., 2014). Pfaller y colaboradores 2010, refiere que la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas recomienda que el tratamiento con Fluconazol debe ser guiado por resultados de perfiles de susceptibilidad antifúngica que presenta *Candida glabrata* debido a la variabilidad de resistencia que presenta (Pfaller et al., 2010).

Se determinó que el 10% de cepas de *Candida tropicalis* son No Sensibles a Micafungina, de acuerdo a los nuevos criterios del CLSI ésta nueva categoría quiere decir, que es necesario confirmar la identificación y repetir pruebas de sensibilidad; en el estudio de Cortés y Russi 2011, mencionan que la resistencia a equinocandinas es infrecuente, sin embargo se encontró una cepa mutante de *Candida albicans* donde presentó resistencia a Anidulafungina y Micafungina (Cortés & Russi, 2011).

Estudios recientes mencionan que Anfotericina B es el fármaco adecuado para tratar infecciones fúngicas, a pesar que se desconozca la especie que está causando daño, éste hecho corrobora con la información obtenida, ya que no se encontró ningún tipo de resistencia a Anfotericina B. (Cornistein et al., 2013) así mismo, en el estudio de Quinteros y colaboradores 2010, se indica que el uso de Anfotericina B tuvo una respuesta favorable en el tratamiento de candidemias, inclusive fue eficaz en pacientes con fármaco-terapia dirigida (Quinteros et al., 2010). En el Ecuador éste medicamento es considerado como un fármaco de alto riesgo ya que los efectos que produce en el organismo pueden ser irreversibles, por esta razón se requiere que las casas de salud posean prácticas específicas para la prescripción y dispensación del mismo (Ministerio de Salud Pública, 2015)

CONCLUSIONES

1. Las características fenotípicas de las especies de *Candida* fueron determinadas por pruebas convencionales; además de ser económicas ayudan a identificar de forma parcial las especies del género *Candida*.
2. El 60% de las cepas aisladas de *Candida* provenientes de diversas casas de salud del Ecuador, pertenece a *C. albicans*, mientras que el 40% restante son especies *no albicans*, del cual *C. tropicalis* fue el segundo más aislado en un 26%.
3. El 53% de las cepas estudiadas provienen de un hospital pediátrico, mostrando así que el mayor caso de candidemias se presentan en el grupo de pacientes pediátricos.
4. De acuerdo a los puntos de corte del CLSI 2008, todas las especies de *Candida* analizadas tanto *albicans* como *no albicans* demuestran sensibilidad a Anidulafungina, Caspofungina, Anfotericina B y Posaconazol.
5. Se identificó que el 95% de las cepas estudiadas fueron sensibles al Fluconazol, por lo tanto, se confirma que puede seguir siendo considerado como tratamiento antifúngico de primera línea de acuerdo a recomendaciones en la práctica clínica sin que hayan sido previamente expuestos a tratamiento con azoles.

RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar investigaciones acerca de la epidemiología de infecciones fúngicas en el Ecuador, ya que los datos existentes son escasos; además establecer protocolos a través del uso de pruebas convencionales que además de ser económicas ayudan a la identificación de las diferentes especies de *Candida*.

Se recomienda ampliar el estudio de cepas de *Candida* resistentes a antifúngicos, en los diferentes niveles de atención de salud mediante pruebas diagnósticas de menor a mayor complejidad incluyendo en éste último grupo a las pruebas moleculares que ayuden a identificar rasgos genéticos de las diferentes especies, distribuyéndolas de acuerdo a los servicios que ofrece los niveles de atención I, II y III.

Es indispensable contar con datos de susceptibilidad antifúngica de cada una de las especies del género *Candida*, en vista de que algunas de las especies *no albicans* son intrínsecamente resistentes a diferentes fármacos antifúngicos, para así contar con una mejor fármaco-vigilancia.

Para identificar un punto de corte más específico a cada antifúngico, es fundamental unificar criterios entre CLSI y EUCAST, para mejorar la interpretación clínica en perfiles de susceptibilidad, ya que ninguno de los dos ofrece una información completa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, J. M., Ruiz camps, I., Muñoz, P., Mensa, J., Altamirante, B., Vázquez, L., ... Cuenca Estrella, M. (2011). Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(5), 345–361. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.008>
- Ahmad, K. M., Kokosar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O. P., & Piskur, J. (2014). Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 529–535. <http://doi.org/10.1111/1567-1364.12145>
- Al Attas, S. A., & Amro, S. (2010). Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Annals of Saudi Medicine*, 30(2), 101–108. <http://doi.org/10.4103/0256-4947.60514>
- Alburquenque, C., Beltrán, S., Olivares, R., Falconer, M., Amaro, J., Fuentes, M., & Tapia, C. (2013). Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Revista Chilena Infectologia*, 30(3), 244–251. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000300002>
- Alburquenque, C., Silva, V., Fuentes, M., Taipa, C., & Silva, V. (2011). In vitro anidulafungin susceptibility of 100 of *Candida* strains obtained previously to the introduction of this echinocandin in Chile. *Revista Chilena de Infectiologica*, 28(5), 399–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051614>
- Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M. del C., Guelfand, L., & Bianchi, M.

- (2010). Identificación presuntiva de *Candida spp.* y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 90–93. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.008>
- Antonio, J. (2012). *Microbiología e Inmunología Oral*. Brasi. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=zIvMzOa-YbYC&pg=PT525&dq=zimograma+caldo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiG7oXkk8bNAhUJJh4KHf8UCI0Q6AEIJDAC#v=onepage&q=zimograma caldo&f=false>
- Araujo da Costa, K., & Barbosa Santiago, S. (2015). Mecanismos de resistencia de *Candida albicans*. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada* (Quinta).
- Arias, A., Valderrama, M., Parra, D., Marín, J., Mazo, L., & Montoya, C. (2012). Caracterización clínica y epidemiológica de los pacientes con infección del tracto urinario asociadas al cuidado de la salud. *Investigación & Educación en Enfermería*, 30(1), 28–34. Retrieved from http://0-www.index-f.com.llull.uib.es/new/cuiden/extendida.php?cdid=675775_1
- Aryal, S. (2015). Germ Tube Test- Principle, Procedure, Results, Interpretation and Limitations. Retrieved from <http://www.microbiologyinfo.com/germ-tube-test-principle-procedure-results-interpretation-and-limitations/>
- Ayats, J., Martín Mazuelos, E., Pemánn, J., Quindós, G., Sánchez, F., García-Rodríguez, J., ... Cuenca Estrella, M. (2011). Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 29(1), 39.e1–39.e15. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.08.005>

- Beyda, N., Lewis, R., & Garey, K. (2012). Echinocandin Resistance in *Candida Species*: Mechanisms of Reduced Susceptibility and Therapeutic Approaches. *Ann Pharmacother*, 46(7-8), 1086–1096. <http://doi.org/10.1345/aph.1R020>
- Bicanic, T. A., & Harrison, T. S. (2014). Infecciones micóticas sistémicas. Retrieved from <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=83056>
- BioRad. (2009). Detección de anticuerpos anti-manano de *Candida* en suero o en plasma humano mediante el método inmunoenzimático. Retrieved from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/62785_881050_ES.pdf
- Botero, M., Herrera Puentes, M., & Cortés, J. (2014). Formas lipídicas de anfotericina. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 518–527. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000500002>
- Brown, A. J. P., Brown, G. D., Netea, M. G., & Gow, N. A. R. (2014). Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends in Microbiology*, 22(11), 614–622. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.001>
- Buzón, L., Lalueza, A., Loureiro, J., Eduardo, F., Antón, Juan Miguel Campo, Borja de Miguel Borja, M., Veganzones, I., ... Pérez, L. (2013). *Manual Amir Infecciosas y Microbiología* (Sexta).
- Caldas, C. D. E. M., Pérez-cárdenas, J. E., & Henao, C. C. (2013). Hongos Aislados De Pacientes Con Micosis Ungueal En La Antimycotic Sensitivity of Different Isolated Fungi Species in Patients With the Onychomycosis in Manizales-Caldas-Colombia.
- Calderone, R., & Cornelius, C. (2011). *Candida and Candidiasis* (Segunda). United States of America. Retrieved from

<https://books.google.com.ec/books?id=9u6rBAAQBAJ&pg=PT571&dq=Calderone+Candida+and+Candidiasis&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiN3eCXssTNAhUIFR4KHb9CAMcQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Calderone+Candida+and+Candidiasis&f=false>

Calvo, B., Mesa, L., Perozo, A., Pineda, M., & Beltrán-Luengo, H. (2010). Cambios en la distribución de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos, en pacientes del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. *Kasmera*, 38(2), 106–117.

Cardona Castro, N., & Rivas, A. M. (2009). Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con qué opciones terapéuticas contamos? *Revista CES Medicina*, 23(1), 61–76. Retrieved from <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/1004/646>

Carrillo, R., & Torres, L. (2013). Prevalencia e incidencia de enfermedades respiratorias en España. *Salud*, 2(1), 5–25. Retrieved from [http://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF revista médica/2013/5 septiembre/1_Liberman.pdf](http://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2013/5%20septiembre/1_Liberman.pdf)

Castañón Olivares, L. R. (2016). Candidiasis o Candidosis. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>

Castillo Blancarte, A. (2013). *Candida*, el enemigo silencioso.

Chakrabarti, A. (2015). *Candida glabrata* candidemia. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 19(3), 138. <http://doi.org/10.4103/0972-5229.152753>

Consejo de Salubridad General. (2009). Diagnóstico y tratamiento de candidiasis invasiva en el adulto. Retrieved from papers3://publication/uuid/6F1814C1-B329-4D5B-BC11-B5A367E6F129

- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., Capparelli, F. J., & del Castillo, M. (2013a). *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies *no albicans*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(6), 380–4. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.011>
- Coronado Castellote, L., & Jiménez Soriano, Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(5), 279–286. <http://doi.org/10.4317/jced.51242>
- Cortés, J. a, & Russi, J. a. (2011). Equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*, 28(6), 529–536. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000700004>
- Cortés, J., Jaimes, J., & Leal, A. (2013). Incidencia y prevalencia de candidemia en pacientes críticamente enfermos en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 599–604. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182013000600004>
- Cruz, R., & Piontelli, E. (2011). Enfermedad fúngica invasora en pacientes de cinco hospitales de la Región de Valparaíso, Chile. 2004 a 2009. *Revista Chilena de Infectología*, 28(2), 123–129. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000200004>
- Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 23(4), 169–176.
- Da Silva, M. E., Braga, F. R., Borges, L. A., Oliveira, P. de, Lima, W. dos S., & Araújo, J. V. (2015). Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos, 82, 1–5.

<http://doi.org/10.1590/1808-1657000942013>

- De la Calle Rodríguez, N., Santa Vélez, C., & Cardona Castro, N. (2012). Virulence factors of *candida albicans* and dermatophytes in keratinized tissues infection. *CES Medicine*, 26(1), 43–55. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a05.pdf>
- De la Torre-Saldaña, V. A., Martinez Velázquez, M., & Reséndiz Sánchez, J. (2014). Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. *Med Int Mex*, 30, 121–132.
- Deorukhkar, S., Saini, S., & Jadhav, P. (2012). Evaluation of different media for germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *International Journal of ...*, 199, 704–707. Retrieved from <http://www.ssjournals.com/index.php/ijbar/article/view/213>
- Dhurba, G. (2015). Germ Tube Test for the identification of *Candida albicans*. Retrieved from <http://laboratoryinfo.com/germ-tube-test/>
- Díaz, A., & Garcés, C. (2012). Uso actual de los antifúngicos triazoles en niños. *Infectio*, 16(Supl 3), 82–93. [http://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70031-0](http://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70031-0)
- Duarte, A., Márquez, A., Araujo, C., & Pérez, C. (2009). Modalidades de la Prueba del Tubo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 66–68.
- El Ahmed, H. H., Cañadas-De la Fuente, G., Fernández-Castillo, R., González-Jiménez, E., Cantero-Hinojosa, J., & Lardón-Fernández, M. (2012). Candidiasis cutánea generalizada en recién nacido a término. *Biomédica*, 170–173. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-

- Escribano, P., Rodríguez-Créixems, M., Sánchez-Carrillo, C., Muñoz, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2013). Endemic genotypes of *Candida albicans* causing fungemia are frequent in the hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2118–2123. <http://doi.org/10.1128/JCM.00516-13>
- Estrada Barraza, D., Dávalos Martínez, A., Flores Padilla, L., Mendoza De Elias, R., & Sánchez Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36–42. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various *non-albicans Candida spp* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954–e966. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006>
- Fernández, B. (2012). *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE ODONTOLOGÍA Departamento de Estomatología III Estudio transversal observacional , sin intervencion terapeutica , para evaluar cancer de cabeza y cuello y factores asociados*. Universidad Computense de Madrid.
- Figueras, C., Heredia, C. D. De, García, J. J., Navarro, M., Ruiz-Contreras, J., Rossich, R., ... Soler-Palacín, P. (2011b). Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Anales de Pediatría*, 74(5). <http://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.12.012>
- Fisher, J. F., Sobel, J. D., Kauffman, C. A., & Newman, C. A. (2011). *Candida* urinary

- tract infections - Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 52(SUPPL. 6), 457–466.
<http://doi.org/10.1093/cid/cir112>
- García-Agudo, L., & García-Martos, P. (2012). Sensibilidad a fluconazol de levaduras de interés clínico. *Rev Esp Quimioter*, 25(4), 266–268.
- García-Vidal, C., & Carratalá, J. (2012). Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(3), 151–158.
<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>
- Gil-Loyzaga, P. E. (2011). *Cultivo de células animales y humanas. aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid. Retrieved from
https://books.google.com.ec/books?id=nQ9ZBQAAQBAJ&pg=PA62&lpg=PA62&dq=el+siero+es+una+mezcla+de+proteinas,+factores+de+crecimiento&source=bl&ots=AnoKSHwthJ&sig=g_mrc-Ix_HHAGv6f8D4hYy_hkmM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj-pcvJme_NAhXI6x4KHTyoDx8Q6AEIHTAA#v=onepage&
- Golia, S., Reddy, K. M., Karjigi, K. S., & Hittinahalli, V. (2013). Speciation of *Candida* using chromogenic and cornmeal agar with determination of fluconazole sensitivity. *Ameen J Med Sci*, 6(2), 163–166.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(1), 33–39.
<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>
- Guillarte, C., Pardi, G., & Perrone, M. (2011). Detección de especies de *Candida* en Agar Candida Cromogénico, a partir de cepas aisladas de muestras de cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 49(4), 1–7. Retrieved from

<http://www.actaodontologica.com/ediciones/2011/4/art25.asp>

Gusiniano, G. G. (2009). Micosis Oportunistas. *Cátedra de Microbiología, Parasitología E Inmunología*, 1, 9. Retrieved from <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE Micosis oportunistas.pdf>

Gutiérrez-Martínez, M. J., Araiza-Santibáñez, J., Hernández, M. A., Chávez-Mayol, J. M., Rodríguez-Piñeyro, O. M., & Bonifaz, A. (2012). Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del hospital general de México. *Dermatologia Revista Mexicana*, 56(2), 93–101.

Hall, R. A., & Gow, N. A. R. (2013). Mannosylation in *Candida albicans*: Role in cell wall function and immune recognition. *Molecular Microbiology*, 90(6), 1147–1161. <http://doi.org/10.1111/mmi.12426>

Han, T.-L., Cannon, R. D., & Villas-Bôas, S. G. (2012). The metabolic response of *Candida albicans* to farnesol under hyphae-inducing conditions. *FEMS Yeast Research*, 12(8), 879–889. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00837.x>

Heras Cañas, V., Ros, L., Solórzano, A., Gutiérrez Soto, B., Navarro Marí, J. M., & Gutiérrez Fernández, J. (2015). Especies de levaduras aisladas en muestras de orina en un hospital regional de España. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 331–334. <http://doi.org/doi:10.1016/j.ram.2015.07.004>

Herwald, S. E., & Kumamoto, C. A. (2014). *Candida albicans* niche specialization: Features that distinguish biofilm cells from commensal cells. *Current Fungal Infection Reports*, 8(2), 179–184. <http://doi.org/10.1007/s12281-014-0178-x>

Himedia. (2015). Corn meal agar. Retrieved from <http://himedialabs.com/TD/M146.pdf>

- Inglis, D., MB, A., Binkley, J., Shah, P., Skrzypek, M., Wymore, F., ... Sherlock, G. (2012). The *Candida* Genome Database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res.* Retrieved from http://www.candidagenome.org/cgi-bin/gbrowse2/gbrowse/cpar_cdc317/?name=Contig005569_C_parapsilosis_CDC317:1431..21907
- Izquierdo, G;Santolaya, M. (2014). Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. *Rev Chilena Infectol*, 31(1), 73–83. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>
- Jagtap, S. A., Saple, P. P., & Dhaliat, S. B. (2011). Congenital cutaneous candidiasis: A rare and unpredictable disease. *Indian Journal of Dermatology*, 56(1), 92–93. <http://doi.org/10.4103/0019-5154.77564>.
- Jiménez Aguiló, A. (2015). Tratamiento con láser para la onicomicosis.
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873–880. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>
- Kurtzman, C., Fel, J., & Boekthout, T. (2011). *The Yeasts: A taxonomic study* (Fifth). United States of America. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=yfg79rlIFIkC&pg=PA93&lpg=PA93&dq=cor+n+meal+agar+procedure+for+inoculated&source=bl&ots=MZP0uzPzwh&sig=1-ZiG_-C1BjxRq1S-

bQ9O1d2KvM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj6yoWjqMfNAhWGGR4KHfrTBOsQ
6AEIYDAI#v=onepage&q=corn meal agar proc

Lobaina, T., Zhurbenko, R., Rodríguez, C., Zayas, Y., & Rodríguez, A. (2010). Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. *Rev Cubana Med Trop*, 62(1), 48–57. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v62n1/mtr08110.pdf>

MacCallum, D. M., Coste, A., Ischer, F., Jacobsen, M. D., Odds, F. C., & Sanglard, D. (2010). Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), 1476–1483. <http://doi.org/10.1128/AAC.01645-09>

Malbrán, C. (2013). Novedades 2013 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Malbrán, C. (2015). Resistencia a los antimicrobianos: causas , consecuencias y perspectivas en Argentina.

Marcos, C. (2013). Candidemia: la importancia médica de los cambios en su etiología y epidemiología. Retrieved from <http://www.ehu.eus/ehusfera/mikrobios/2013/07/17/candidemia-la-importancia-medica-de-los-cambios-en-su-etilogia-y-epidemiologia-xxiv-congreso-de-microbiologia-sem-lhospitalet-barcelona-julio-2013/>

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <http://doi.org/10.4161/viru.22913>

Ministerio de Salud Pública. (2015). *Manejo de medicamentos de alto riesgo y concentrado de electrolitos*. Machala.

- Montúfar-Andrade, F. E., Villa-Franco, J. P., Montúfar-Pantoja, M. C., Cadavid-Usuga, J. C., Monsalve, M. A., Zuluaga, M., ... Madrid, C. (2015). Compromiso pulmonar en pacientes hospitalizados con infección por el virus de inmunodeficiencia humana en el Hospital Pablo Tobón Uribe (Medellín, Colombia). *Infectio*. <http://doi.org/10.1016/j.infect.2015.10.004>
- Morales, Y., Moncada, D., Arroyo, S., Sánchez, M. del C., Manzano, P., & Arenas, R. (2013). Candidemias en un hospital general de la Ciudad de México: estudio de sensibilidad a antifúngicos con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo. *Dermotol Rev Mex*, 57, 155–158.
- Moyes, D. L., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2015). *Candida albicans*- epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. *Virulence*, 6(4), 338–346. <http://doi.org/10.1080/21505594.2015.1012981>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología Médica*. Barcelona.
- Naglik, J. R., Richardson, J. P., & Moyes, D. L. (2014). *Candida albicans* Pathogenicity and Epithelial Immunity. *PLoS Pathogens*, 10(8), 8–11. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004257>
- Nieto, V. (2011). Levadura. Retrieved from http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Levadura
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., ... Colombo, A. L. (2013). Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE*, 8(3), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>

- Odio, C. M. (2010). Terapia antifúngica para neonatos , invasiva sospechada o documentada. *Drugs of Today*, 46(Supplement C), 33–46.
- OMS. (2015). Enfermedades no transmisibles. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Oncul, B., Karakis, D., & Dogruman Al, F. (2015). The effect of two artificial salivas on the adhesion of *Candida albicans* to heat- polymerized acrylic resin, 7(2), 93–97. <http://doi.org/10.4047/jap.2015.7.2.93>
- Ortigoza-Medrano, E., & Arroyo-Espinosa, D. (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el hospital de especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de Mexico*, 30(4), 373–380.
- Palacios, C. P., Gómez, L. M., & Cardona, N. (2010). Candidiasis mucocutánea. Retrieved from [http://www.revistasocolderma.org/files/Volumen 19 Numero 3 septiembre 2011.pdf#page=55](http://www.revistasocolderma.org/files/Volumen%2019%20Numero%203%20septiembre%202011.pdf#page=55)
- Paniagua Contreras, L. G., Monroy Pérez, E., Pineda Olvera, J., Negrete Abascal, E., & Vaca Pacheco, S. (2010). Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos. *Rev Med Hosp Gen Mex*, 73(2), 94–101. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2010/hg102d.pdf>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, Jr., D. K., Calandra, T. F., Edwards, Jr., J. E., ... Sobel, J. D. (2009). Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(5), 1–35. <http://doi.org/10.1086/598961>

- Pérez, J. E., Carolina Cárdenas, C., & Hoyos, A. M. (2011). Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomycosis en un laboratorio de referencia, Manizales (caldas), 2009. *Infectio*, 15(3), 168–176. [http://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70081-9](http://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70081-9)
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal Drug Resistance : Mechanisms , Epidemiology , and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1), S3–S13. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Barton, R., Bijie, H., ... Zaidi, M. (2010). Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(2), 162–171. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.01.002>
- Puel, A., Cypowyj, S., Maródi, L., Abel, L., Picard, C., & Casanova, J. L. (2012). Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(6), 616–622. <http://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328358cc0b>
- Quintana, Á. (2013). Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Quinteros, R., Fica, A., Abusada, N., Muñoz, L., Novoa, C., & Gallardo, C. (n.d.). Uso de anfotericina B deoxicolato y sus reacciones adversas en un hospital universitario en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 27(1), 25–33. <http://doi.org/10.4067/S0716->

- Romero, A., Garcés, R., Luengo, J., Gomar, S., Fernández, J. A., & Gregori, J. (2013). Candidiasis invasiva: endocarditis por *Candida parapsilosis* sobre válvula aórtica protésica. *Medicina Intensiva*, 37(2), 116–121. <http://doi.org/10.1016/j.medin.2012.05.001>
- Romero-Luévano, Á. G., Araiza-Santibáñez, J., Hernández, M. A., Cerón-Araiza, M., Hernández-Guzmán, V. A., Ponce, R. M., & Bonifaz, A. (2014). Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del hospital general de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. *Dermatología Revista Mexicana*, 58(3), 239–246.
- Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., & Godinho Vilela, Simone Furgeri Dos Santos, Jéssica Diane Cardoso Jorge, Antonio Olavo Campos Junqueira, J. (2013). Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 12(3), 199–204. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-32252013000300009>
- Ruiz, M. (2011). Patogenia. Retrieved from http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Patogenia
- Santolaya, M. E., Alvarado Matute, T., de Queiroz Telles, F., Colombo, A. L., Zurita, J., Tiraboschi, I. N., ... Nucci, M. (2013). Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(3), 158–170. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.012>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm

- formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Schachner, L. A., & Hansen, R. C. (2011). *Pediatric Dermatology* (Cuarta). Estados Unidos. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=tAlGLYplkacC&printsec=frontcover&dq=lawrence+Pediatric+Dermatology&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjn5oCThMbNAhWJ6xQKHb8yDRMQ6AEIHzAA#v=onepage&q=lawrencePediatricDermatology&f=false>
- Selmecki, A., Forche, A., & Berman, J. (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 9(7), 991–1008. <http://doi.org/10.1128/EC.00060-10>
- Shareck, J., Nantel, A., & Belhumeur, P. (2011). Conjugated Linoleic Acid Inhibits Hyphal Growth in *Candida albicans* by Modulating Ras1p Cellular Levels and Downregulating. *Eukariot Cell*, 10(4), 565–577. <http://doi.org/10.1128/EC.00305-10>
- Solís, F., & Linares, M. J. (n.d.). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, (Capítulo 3), 1–20.
- Staniszewska, M., Bondaryk, M., Siennicka, K., Kurek, A., Orłowski, J., Schaller, M., & Kurzątkowski, W. (2012). In vitro Study of Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 to Sap3 and Sap4 to Sap6 Expression in *Candida albicans* Pleomorphic Forms. *Polish Journal of Microbiology*, 61(4), 247–256.
- Staniszewska, M., Bondaryk, M., Siennicka, K., & Kurzątkowski, W. (2012). Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: Phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Polish Journal of Microbiology*,

61(2), 129–135.

Sumitra, D., & Maheshwari, M. (2014). Speciation of *Candida* Species Isolated From Clinical Specimens by Using Chrom Agar and Conventional Methods. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(3), 1–5.

Tanaka, K. (2012). *Candida albicans*. *DataBio*, 12(34), 2433–2442. <http://doi.org/10.1128/AAC.01366-12>

Tiago, F. C. P., Martins, F. S., Souza, E. L. S., Pimenta, P. F. P., Araujo, H. R. C., Castro, I. M., ... Nicoli, J. R. (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 61(PART 9), 1194–1207. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.042283-0>

Tzar, M., Noor Hasliza, Z., & Salmah, I. (2013). Antifungal susceptibility patterns of germ tube positive versus germ tube negative *Candida* isolates. *Research Updates in Medical Sciences*, 1(1), 13–16.

Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz Shouval, R., Whitesell, L., & Lindquist, S. (2013). Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. *PLoS Biology*, 11(10), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692>

Wilcock, B. C., Endo, M. M., Uno, B. E., & Burke, M. D. (2013). C2'-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human Cells but Not Yeast Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135(23), 8488–8491. <http://doi.org/10.1021/ja403255s>

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance* (Vol. 61). <http://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>

- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10(1), 95–105. <http://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>
- Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., ... Romani, L. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372–385. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>
- Zomorodian, K., Javad Rahimi, M., Pakshir, K., Motamedi, M., Rahimi Ghiasi, M., & Rezashah, H. (2011). Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(4), 357–360. <http://doi.org/10.4103/0974-777X.91059>

ANEXOS

ANEXO I Procedimiento recuperación de cepas de *Candida*

Día 1:

- Se tomó la muestra con un asa estéril de las cepas conservadas en crioviales con BHI + 20% de glicerol y se procedió a sembrar en Agar Sabouraud.
- Seguidamente se incubaron en una estufa a 27 °C por 48 horas.

Día 2:

- Se aislaron las colonias de *Candida* y se transfirieron a un tubo plástico cónico de 1,5 mL con caldo de BHI + glicerol al 20%, por consiguiente se preservaron en la congeladora a -70°C. (Tiago et al., 2012)

ANEXO II Procedimiento de la prueba de tubo germinal

Principio

La formación de tubo germinal se asocia con aumento de la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico. La solución del Tubo germinal contiene caldo de soja tríptico y suero bovino fetal, nutrientes esenciales para la síntesis de proteínas. El tubo germinal es uno de los factores de virulencia de *Candida albicans*.

Procedimiento

- Poner 0,5 ml de oveja o suero humano en un tubo pequeño.
Nota: suero bovino fetal también se puede utilizar en lugar de suero humano.
- Con una pipeta Pasteur, toque una colonia de levadura y suavemente se emulsiona en el suero.
Nota: Demasiado grande de un inóculo se inhibe la formación de tubo germinal.
- Incubar el tubo a 37 ° C durante 2 a 4 horas.
- Transferir una gota de suero a un portaobjetos para su análisis.
- Cubrir con un cubreobjetos y examinar microscópicamente en virtud de los objetivos de baja y alta potencia.

Prueba positiva: Hifas cortas presentan una extensión (filamentoso) derivados lateralmente desde una célula de levadura, sin constricción en el punto de origen. El tubo germinal es la mitad de la anchura y 3-4 veces la longitud de la célula de levadura y no hay presencia de núcleo. Ejemplos: *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

Prueba negativa: No hay extensión de hifas (filamentosas) derivada de una célula de levadura o una extensión de las hifas cortas constreñida en el punto de origen. Ejemplos: *C. tropicalis*, *C. glabrata* y otras levaduras

Limitaciones de la prueba de Tubo Germinal

C. tropicalis pueden formar pseudohifas temprana que puede interpretarse falsamente como tubos germinales.

La levadura *Candida stellatoidea* anteriormente llamado también produce tubos germinales; sin embargo, se ha combinado con *C. albicans* y ya no existe como especie separada. Esta prueba es sólo una parte del esquema general para la identificación de levaduras. se necesitan más pruebas para la identificación definitiva.(Aryal, 2015)

ANEXO III Procedimiento para identificación morfológica y clamidosporas en agar harina de maíz

Agar harina de maíz

A este medio comercializado (Oxoid) debe agregarse Tween 80 (polisorbato) a una concentración final de 0,02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias.

Procedimiento

1. La inoculación se debe realizar, según la técnica de Dalmau, haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un ángulo aproximado de 45°.
2. Colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra.
3. Incubar las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 h y luego examinar al microscopio a través del cubre-objetos en 10X y 40X

(Solís & Linares, n.d.)

ANEXO IV CHROMagar® principios de procedimiento



INSTRUCCIONES DE USO –
MEDIOS EN PLACA LISTOS
PARA USAR



PA-257480.05

Rev.: July 2014

BBL™ CHROMagar™ Candida Medium

USO PREVISTO

BBL CHROMagar Candida Medium es un medio para el aislamiento y la identificación de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de muestras clínicas. Inhibe el crecimiento de bacterias y también puede utilizarse como medio de aislamiento selectivo para otras especies de levaduras y para hongos filamentosos.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

BBL CHROMagar Candida Medium es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento¹⁻⁴. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blanquecino. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida [Torulopsis] glabrata* y otras especies). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias^{1,4,5}.

Peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en BBL CHROMagar Candida Medium. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos.

CHROMagar Candida Medium fue desarrollado por A. Rambach y lo distribuye BD Diagnostic Systems bajo acuerdo de licencia con CHROMagar, Paris, Francia.

REACTIVOS

BBL CHROMagar Candida Medium

Fórmula* por litro de agua purificada

Cromopectona	10,0 g
Glucosa	20,0
Mezcla cromógena	2,0
Cloranfenicol	0,5
Agar	15,0

pH 6,0 ± 0,3

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

. Solamente para uso profesional.

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro.

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el

PA-257480.05

- 1 -

calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los periodos de incubación recomendados. Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener los detalles, véase el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO). Incubar las placas en atmósfera aerobia durante 20 – 48 h a 35 ± 2 °C. Tener en cuenta que se requiere una incubación de 42 h para que las colonias desarrollen por completo el color.

Cepas	BBL CHROMagar Candida Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Crecimiento de bueno a excelente; colonias grandes y planas, de color de rosado claro a rosa, con un borde blanquecino
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13639	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9958	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color gris azulado, con o sin halos de color violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inhibición de parcial a completa
Sin inocular	De incoloro a beige claro, transparentes

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BBL CHROMagar Candida Medium (placas Stacker de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

Material no suministrado

Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación directa de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de todos los tipos de muestras clínicas. También puede utilizarse para el aislamiento de otros hongos (véase también CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO).

Procedimiento de análisis

Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa. Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 20 – 48 h en posición invertida. Se requiere una incubación de 42 para que se desarrolle por completo el color de las colonias *Candida*. Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.

Ciertos aislados, tales como *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos, requieren una incubación más prolongada y posiblemente una temperatura de incubación inferior para obtener un crecimiento óptimo. Por tanto, debe inocularse e incubarse a 20 – 25 °C una placa con un segundo medio fúngico (por ejemplo BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol) si se prevé la presencia de hongos diferentes de la especie *Candida*.

Resultados

Después de la incubación, las placas de las muestras con hongos presentarán crecimiento. Se recomienda efectuar la lectura de las placas sobre un fondo blanco. Si están presentes

especies de *Candida*, las colonias presentarán un color verde de claro a mediano (*C. albicans*), rosado claro a rosa con un borde blanquecino (*C. krusei*) o bien azul verdoso a azul metálico con o sin halos violetas (*C. tropicalis*). Otras especies de *Candida* y otras levaduras presentan un color malva de claro a oscuro (rosado a violeta) o, si no se utilizan sustratos cromógenos, presentarán su color natural de colonias (de crema a blanco). Los datos de estudios diversos indican que no es necesario realizar pruebas de identificación adicionales para *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*⁸⁻⁹.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El uso de CHROMagar Candida Medium para la identificación directa de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* ha sido documentado en numerosos estudios que también pueden consultarse para obtener información adicional acerca de los procedimientos recomendados⁷⁻⁹. Los resultados de una evaluación de rendimiento reciente de BBL CHROMagar Candida Medium fueron notificados por Jabra-Rizk y colegas⁸.

Candida (Torulopsis) glabrata habitualmente produce colonias de color malva a malva oscuro en este medio². No obstante, se recomienda que los organismos que aparecen con este color se confirmen mediante pruebas bioquímicas adicionales, dado que este color de colonia puede ser producido por diversas especies de levaduras.

Las colonias que presentan un color de rosado pálido o malva claro a oscuro, o bien muestren su color crema natural en este medio, deben identificarse mediante métodos estándar^{7,8}.

Las levaduras diferentes de las especies anteriormente mencionadas y los hongos filamentosos también pueden aislarse en este medio si se incuban a una temperatura y durante un periodo apropiados para estos organismos.

Dado que los mohos y otros hongos filamentosos pueden metabolizar los sustratos cromógenos, los colores presentados por estos organismos en BBL CHROMagar Candida Medium pueden ser diferentes de los mostrados en otros medios fúngicos. No utilizar el aspecto del crecimiento de los hongos filamentosos en este medio para su identificación morfológica tradicional.

Se ha informado que *C. dubliniensis* produce un color verde oscuro distintivo al realizar el aislamiento primario en BBL CHROMagar Candida Medium^{10,11}. Sin embargo, esta propiedad tal vez no se conserve en el subcultivo. Se requieren pruebas fenotípicas y genotípicas adicionales para la confirmación de *C. dubliniensis*.

Antes de utilizar BBL CHROMagar Candida Medium por primera vez, se recomienda practicar con el aspecto de colonia característico de cepas definidas de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, por ejemplo, las cepas mencionadas en CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO.

REFERENCIAS

1. Odds, F.C., and R. Bemaerts. 1994. CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1923-1929.
2. Pfaller, M.A., A. Huston, and S. Coffman. 1996. Application of CHROMagar Candida Medium for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 56-61.
3. Beighton, D., R. Ludford, D.T. Clark, S.R. Brailford, C.L. Pankhurst, G.F. Tinsley, J. Fiske, D. Lewis, B. Daly, N. Khalifa, V. Mamen, and E. Lynch. 1995. Use of CHROMagar Candida Medium medium for isolation of yeasts from dental samples. *J. Clin. Microbiol.* 32: 3025-3027.
4. Jabra-Rizk, M.A. et al. 2001. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida Medium. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2015-2016.
5. Bautiers, T.G., and Nella, H.J. 2002. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1838-1839.
6. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ANEXO V Preparación de medios para Zimograma-Auxonograma

Caldo carbohidratado de rojo fenol

Tripticasa	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Extracto de carne (opcional)	1 g
Rojo fenol	0,018 g
(7,2 ml de solución de rojo fenol 0,25%)	
Agua destilada y desionizada	1000 ml
Carbohidratos	10 g

PROCEDIMIENTO

- Preparar el caldo mezclando todos los ingredientes en 1.000 ml de agua destilada y desionizada; calentar suavemente para disolver.
- Utilice un único hidrato de carbono para cada lote de medio preparado. Llenar los tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm con 4 a 5 ml de Caldo carbohidratado de rojo fenol.
- Insertar un tubo de fermentación invertida o tubo Durham para detectar la producción de gas.
- Esterilizar medios en autoclave durante 15 minutos a 116 a 118 °C.
- El proceso de esterilización también impulsará el caldo de fermentación en el tubo invertido o un tubo Durham. Cuando se utiliza arabinosa, lactosa, maltosa, salicina, sacarosa, trehalosa, o xilosa, autoclave a 121 ° C durante sólo 3 minutos como estos hidratos de carbono están sujetos a la degradación por tratamiento en autoclave. El caldo de cultivo será de un color rojo claro. El pH final debe ser $7,4 \pm 0,2$.
- Alternativamente, mezclar todos los ingredientes excepto los hidratos de carbono en 800 ml de agua destilada y desionizada para preparar el caldo de base. Exponer al calor mientras se mezcla. Llenar los tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm con 4,5 ml de caldo de base. Insertar un tubo de fermentación invertida o tubo Durham para detectar la producción de gas. Esterilizar caldo de base mediante tratamiento en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C. esterilizar el caldo base y enfriar en un baño de agua 42 a 50 °C antes de añadir hidratos de carbono. Preparar la solución de hidrato de carbono mediante la disolución de 10 gramos de hidratos de carbono deseada en 200 ml de agua destilada y desionizada y esterilizar por filtración de la solución a través de un filtro de membrana de retención de bacterias con un tamaño de poro de 0,45 micras.
- Añadir asepticamente 0,5 ml de filtrado a cada tubo de caldo esterilizado y enfriado. Agitar suavemente para mezclar. El caldo de cultivo será de un color rojo claro. El pH final debe ser $7,4 \pm 0,2$.
- Enfriar todos los medios de cultivo antes de su uso. si preparó medios de cultivo a 4-10 ° C . Los medios refrigerados tienen una vida útil de aproximadamente 6 a 8 semanas. Ejecutar controles para comprobar la posible degradación de los carbohidratos.

NOTAS: generalmente, la concentración de hidratos de carbono usado para la prueba de hidratos de carbono de fermentación es 0,5% o 1,0%. El procedimiento proporcionado producirá un caldo de hidratos de carbono 1,0%. Se prefiere usar una concentración de hidratos de carbono 1,0% para evitar la reacción de reversión debido a la rápida disminución de los hidratos de carbono por algunos microorganismos.

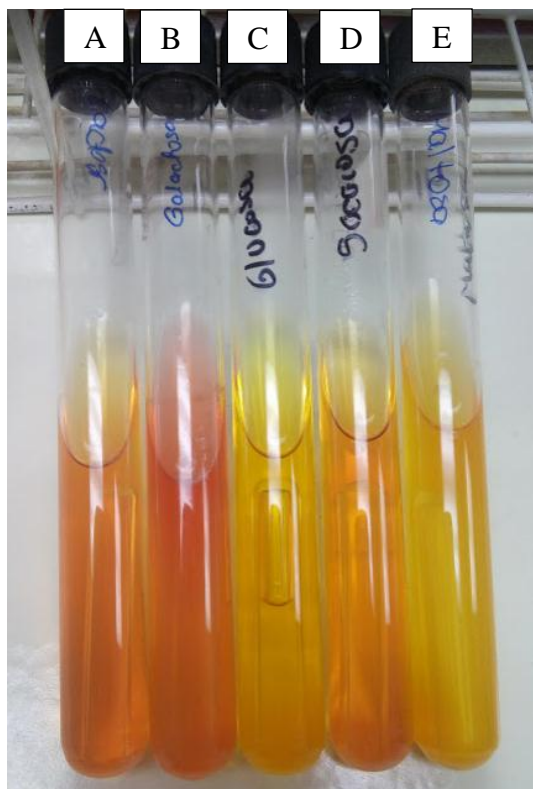


Figura 7. Prueba de Zimograma-Auxonograma. A) Lactosa B) Galactosa C) Glucosa D) Sacarosa E) Maltosa

ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

ANEXO VI Procedimiento de Inoculación por método de dilución colorimétrica

- 1) De un cultivo de 48 horas seleccionar menos de 1 mm de una colonia aislada y disolver en agua estéril (los tubos deben estar previamente rotulados).
- 2) Mezclar por 15 segundos en un vórtex hasta que tenga una apariencia homogénea sin grumos y medir a un estándar McFarland de 0,5 en el nefelómetro.



Figura 8. Escala 0.5 Mcfarland.
ELABORADO POR: JENNY GUERRERO, 2016

- 3) Con una pipeta suspender 20 μ L de la suspensión anterior al caldo de inóculo YeastOne^R y mezclar por 5 segundos en el vórtex.
- 4) Dispense el caldo de inóculo YeastOne^R a una caja de vidrio estéril
- 5) Rotular la placa del Sensititre con el número respectivo de muestra. Transferir 100 μ L a cada pocillo con la ayuda de una pipeta sin topar las paredes ni el fondo del pocillo
- 6) Cubrir la paca con la lámina adhesiva evitando la formación de arrugas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Los resultados pueden ser interpretados cuando el primer pocillo de control de crecimiento haya cambiado de color a rosado, si el pocillo continúa de un color azul se debe incubar 24 horas más para su posterior lectura.

Tabla de interpretación de resultados

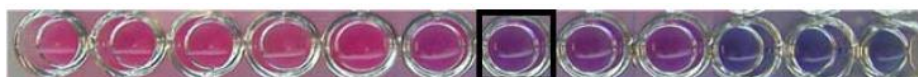
Concentración de pocillo $\mu\text{g/ml}$	1	2	4	8	16	32	R = ROJO: Indicativo de crecimiento positivo B = AZUL: Indicativo de crecimiento negativo
A.	R	R	R	B	B	B	Pauta de crecimiento típica. El punto final de la CIM es 8 $\mu\text{g/ml}$.
B.	R	R	R	R	R	R	Crecimiento en todos los pocillos; el punto final de la CIM es >32 $\mu\text{g/ml}$.
C.	B	B	B	B	B	B	No hay crecimiento en ningún pocillo; el punto final de la CIM es ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$.
D.	R	R	R	B	R	R	"Pocillo saltado". La CIM es >32 $\mu\text{g/ml}$. si existe crecimiento en los pocillos de cualquier lado. Si se produce más de un "salto" en una columna, los resultados de prueba no serán válidos ¹
E.	R	R	B	B	R	R	"Pocillo saltado" doble. La prueba debe repetirse ¹

¹ Estas situaciones no son frecuentes si las técnicas se ejecutan con cuidado.

El pocillo que indique el cambio de color obvio, corresponderá a la concentración mínima inhibitoria de esa muestra.



Puntos finales con trailing: existe un cambio de color en varios pocillos con distintas concentraciones. La lectura de la concentración mínima inhibitoria debe realizarse en el pocillo que tenga el primer cambio de color evidente o menos intenso comparado con el primero.



En el caso del Itraconazol pueden existir concentraciones $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. O que se puede reflejar produciendo crecimiento y cambiando de color a rojo.



Contaminación

Los cambios de color rosa entre pocillos azules demuestra crecimiento para o cual es necesario realizar un subcultivo para determinar el origen de la contaminación.



ANEXO VII Criterios para interpretación de CIM para especies de *Candida* CLSI.-

La tabla indica el agente antifúngico, la sensibilidad, sensible dosis-dependiente, intermedio, resistente y no sensible

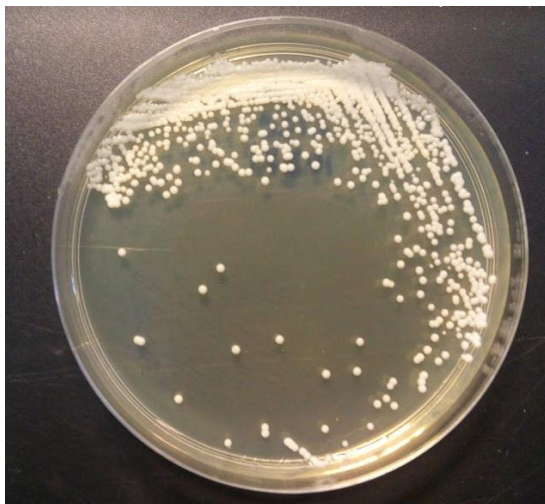
Agente Antifúngico	Sensible	Sensible dosis-dependiente	Intermedio	Resistente	No Sensible
Anidulafungina	≤2				>2
Caspofungina	≤2				>2
Fluconazol*	≤8	16 - 32		≥64	
Itraconazol	≤0.125	0.25 - 0.5		≥1	
Micafungina	≤2				>2
Flucitosina	≤4		8 - 16	≥32	
Voriconazol	≤1	2		≥4	

Se considera que las cepas clínicas de *Candida krusei* son intrínsecamente resistentes al fluconazol y sus concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) no deben interpretarse de acuerdo con esta escala

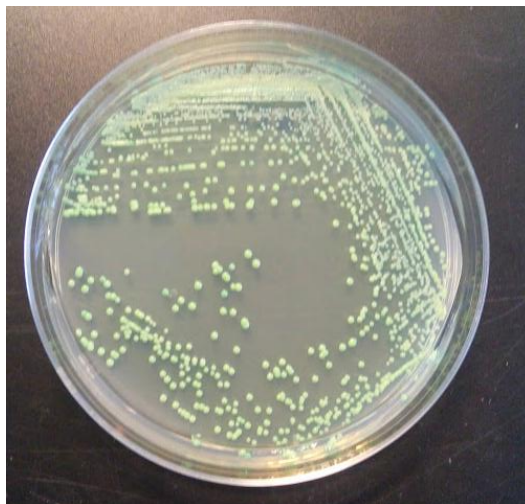
ANEXO VIII Puntos de corte EUCAST, 2015.- La tabla muestra los puntos de corte para cada especie ante los siguientes antifúngicos: AnfotericinaB, Anidulafungina, Caspofungina, Fluconazol, Isavuconazol, Itraconazol, Micafungina, Posaconazol y Voriconazol.

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)														Notes
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints ¹		
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	
Amphotericin B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE	1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints.
Anidulafungin	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE	IE	2. The ECOFFs for these species are in general higher than for <i>C. albicans</i> .
Caspofungin	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	IE ²	IE ²	IE	IE	3. Isolates that are susceptible to anidulafungin as well as micafungin should be considered susceptible to caspofungin, until caspofungin breakpoints have been established. Similarly, <i>C. parapsilosis</i> isolates intermediate to anidulafungin and micafungin can be regarded intermediate to caspofungin. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin.
Fluconazole	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	2	4	4. MICs for <i>C. tropicalis</i> are 1-2 two-fold dilution steps higher than for <i>C. albicans</i> and <i>C. glabrata</i> . In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for <i>C. tropicalis</i> than for <i>C. albicans</i> at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for <i>C. krusei</i> are approximately three two-fold dilution steps higher than those for <i>C. albicans</i> and, similarly, those for <i>C. guilliermondii</i> are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Itraconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.12	0.12	0.12	0.12	IE ²	IE ²	IE	IE	
Micafungin	0.016	0.016	0.03	0.03	IE ⁴	IE ⁴	0.002	2	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE	IE	
Posaconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.06	0.06	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE	IE	5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antifungal susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint they should be reported resistant.
Voriconazole	0.12 ⁵	0.12 ⁵	IE	IE	IE	IE	0.12 ⁵	0.12 ⁵	0.12 ⁵	0.12 ⁵	IE ²	IE ²	IE	IE	

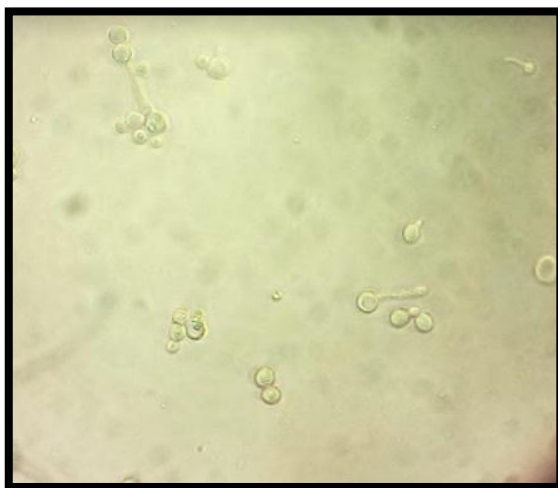
ANEXO IX Control de calidad en medios de cultivo



C. albicans ATCC 10231
Sabouraud



C. albicans ATCC 10231
CHROMagar



C. albicans ATCC 10231
Tubo germinal positivo

ANEXO X Características fenotípicas de las cepas estudiadas. - En la tabla se muestran la base de datos de las cepas analizadas, la fecha de aislamiento, género del paciente, edad (años), muestra, microorganismo aislado, crecimiento a 27 °C, tubo germinal, clamidosporas, hifas verdaderas/pseudohifas y color en agar cromogénico.

#	FECHA	GENERO	EDAD (años)	MUESTRA	MICROORGANISMO	CRECIMIENTO A 27 °C	TUBO GERMINAL	CLAMIDOSPORAS	HIFAS VERDADERAS/ PSEUDOHIFAS	COLOR EN AGAR CROMOGENICO
1	28-abr-10	F	0,16	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	verde
2	28-abr-10	M	0,08	LCR	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	verde
3	28-abr-10	M	0,25	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	verde
4	05-mar-10	M	40	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
6	25-feb-10	M	13	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	verde
7	23-feb-10	F	25	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
8	17-feb-10	F	28	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	azul
9	28-ene-10	F	50	S. Faríngea	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
10	28-ene-10	F	63	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
11	28-ene-10	M	32	Lavado bronquial	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
12	04-feb-10	M	1	Catéter	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
13	04-feb-10	F	29	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
14	09-feb-10	F	50	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
15	22-ene-10	M	8	LCR	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón oscuro
16	22-feb-10	M	1	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón oscuro
17	15-ene-10	M	27	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
18	24-ene-08	M	31	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
19	14-ene-10	M	41	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
20	12-feb-10	F	47	Onicomiosis	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón oscuro
21	24-feb-10	M	59	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
22	24-mar-10	M	61	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde

23	14-abr-10	M	74	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
24	05-may-10	M	0,33	Lavado bronquial	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	azul
25	26-jul-13	M	0,08	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
26	31-jul-13	M	0,25	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
27	31-jul-13	M	1	Catéter	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
28	10-may-13	F	11	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	marrón oscuro
29	31-jul-13	M	0,16	Orina	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	verde
30	06-ago-13	M	0,8	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	azul
31	07-ago-13	M	0,8	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
32	07-ago-13	M	0,25	Orina	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	marrón oscuro
33	15-ago-13	M	0,42	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
34	15-ago-13	M	8	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	azul
35	18-jul-13	M	0,16	Orina	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	marrón oscuro
36	26-jul-13	M	6	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	azul
37	25-jul-13	M	0,16	Orina	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	marrón claro
38	19-jul-13	F	0,42	Sangre	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
39	18-jul-13	M	0,16	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
40	25-jul-13	M	0,25	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
41	19-jul-13	F	14	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
42	18-jul-13	M	0,92	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	gris azulado
43	06-ago-13	F	13	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
44	17-jul-13	F	10	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
45	17-jul-13	F	3	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
46	17-jul-13	M	12	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
47	17-jul-13	F	0,92	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
48	17-jul-13	M	3	Sonda vesical	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
49	12-jul-13	F	0,41	Sangre	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
50	12-jul-13	F	0,42	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
51	12-jul-13	F	0,42	Orina	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
52	10-jul-13	M	0,17	S. Herida	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde

53	10-jul-13	F	15	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
54	07-jun-12	M	0,08	Sangre	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	amarillo oscuro
55	28-may-13	F	0,016	Orina	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	marrón oscuro
56	16-abr-13	F	7	S. Vaginal	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	marrón oscuro
57	11-abr-13	F	0,42	Orina	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
58	05-abr-13	F	0,33	Aspirado gástrico	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
59	07-ago-12	F	20	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
60	10-mar-12	M	0,75	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
61	06-mar-12	F	0,08	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
62	06-mar-12	F	0,0027	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
63	25-feb-12	M	5	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
64	24-feb-12	M	0,42	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
65	01-feb-12	F	7	S. Endotraqueal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
66	12-feb-08	M	38	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
67	25-feb-08	M	61	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
68	08-abr-08	M	53	Palma de mano	<i>C. parapsilosis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	rosado
69	17-mar-08	F	3	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
70	14-mar-08	F	82	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	azul
71	07-abr-08	M	61	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
72	10-abr-08	F	65	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
73	01-abr-08	F	66	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
74	31-mar-08	M	50	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
75	08-abr-08	M	53	Ingle	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
76	07-abr-08	M	42	Escamas glande	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
77	24-ene-08	F	34	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
78	01-ene-08	M	31	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
79	18-ene-08	F	10	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
80	17-oct-07	M	42	Espuito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
81	21-jul-08	F	0,58	Cepa A1053	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	gris azulado
82	11-jun-08	F	65	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde

83	21-jul-08	F	11	Orina	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
84	10-ene-07	M	72	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
85	10-jun-08	F	2	Onicomycosis	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
86	24-jun-08	F	42	Onicomycosis	<i>C. pseudotropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón claro
87	16-jun-08	M	47	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
88	11-jul-08	F	43	Lavado bronquial	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	azul
89	26-jun-08	M	65	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
90	07-may-08	F	30	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
91	27-jun-08	F	0,16	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	verde
92	31-jul-13	M	12	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	marrón claro
93	20-ago-10	F	12	Aspirado gástrico	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
94	26-jun-08	F	79	Espito	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
95	06-jun-08	M	42	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
96	29-jul-08	M	25	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
97	30-may-08	F	64	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
98	07-ago-08	M	85	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
99	26-may-08	M	80	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde
100	17-abr-16	F	2	Orina	<i>C. lusitaniae</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	marrón oscuro
101	30-ene-08	M	40	Onicomycosis	<i>C. albicans</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	verde

ANEXO XI Resultados en CHROMagar®

Microorganismo

C. albicans



C. tropicalis



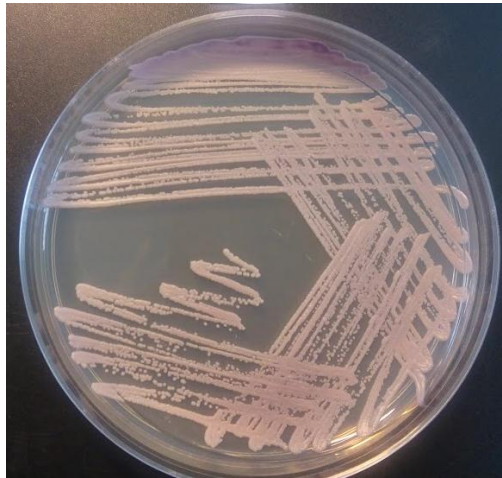
C. guilliermondii



C. glabrata



C. parapsilosis



C. lusitaniae



ANEXO XII Concentración mínima inhibitoria de cepas estudiadas. En la tabla se muestra las cepas a las que se les realizó perfil de susceptibilidad, se describe el número de la muestra, el género de paciente, edad, muestra, microorganismo y la concentración mínima inhibitoria que presentaron las distintas especies ante antifúngicos. Acrónimos: AND (Anidulafungina), AB (Anfotericina B), MF (Micafungina), CAS (Caspofungina), FC (5-Flucitosina), PZ (Posaconazol), VOR (Voriconazol), IZ (Itraconazol), FZ (Fluconazol)

#	GENERO	EDAD (años)	MUESTRA	MICROORGANISMO	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µg/mL)								
					AND	AB	MF	CAS	FC	PZ	VOR	IZ	FZ
2	M	0,08	LCR	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0.015	1	≤ 0.008	0.03	≤ 0.06	0.03	0.03	0.06	1
6	M	13	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	4	2	0.12	0.03	0.015	0.12	0.5
12	M	1	Catéter	<i>C. tropicalis</i>	1	1	2	2	0.12	0.06	0.06	0.12	1
15	M	8	LCR	<i>C. tropicalis</i>	0.12	1	0.12	1	≤ 0.06	0.06	0.03	0.25	2
31	M	0,8	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	1	0.5	0.12	0.03	0.03	0.12	0.5
38	F	0,42	Sangre	<i>C. guilliermondii</i>	1	0.5	1	1	0.12	0.06	0.03	0.12	1
47	F	0,92	S. Vaginal	<i>C. albicans</i>	0.03	1	≤ 0.008	0.06	≤ 0.06	0.015	≤ 0.008	0.03	≤ 0.12
48	M	3	Sonda vesical	<i>C. albicans</i>	0.03	0.5	≤ 0.008	0.06	≤ 0.06	≤ 0.008	≤ 0.008	≤ 0.015	≤ 0.12
49	F	0,41	Sangre	<i>C. guilliermondii</i>	1	0.5	1	0.5	0.12	0.06	0.03	0.12	1
52	M	0,17	S. Herida	<i>C. albicans</i>	0.03	0.5	≤ 0.008	0.12	0.5	0.015	≤ 0.008	0.06	0.25
56	F	7	S. Vaginal	<i>C. glabrata</i>	0.06	0.5	≤ 0.008	0.12	≤ 0.06	2	2	8	64
58	F	0,33	Aspirado gástrico	<i>C. tropicalis</i>	0.12	0.5	0.06	1	≤ 0.06	0.06	0.03	0.25	1
60	M	0,75	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	1	0.5	1	1	0.12	0.03	0.015	0.06	0.5
61	F	0,08	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	≤ 0.06	0.015	≤ 0.008	0.03	0.5
64	M	0,42	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	≤ 0.06	0.015	0.015	0.03	0.5
68	M	53	Palma de mano	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.25	0.25	1	8	0.03	0.12	0.03	4
75	M	53	Ingle	<i>C. albicans</i>	≤ 0.015	0.25	≤ 0.008	0.03	≤ 0.06	≤ 0.008	≤ 0.008	≤ 0.015	≤ 0.12
76	M	42	Escamas glande	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	≤ 0.06	0.03	0.03	0.06	1
91	F	0,16	Sangre	<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.5	0.5	1	0.12	0.015	0.03	0.03	0.5
100	F	2	Orina	<i>C. lusitaniae</i>	0.12	0.5	0.06	0.5	≤ 0.06	0.03	≤ 0.008	0.06	0.5